

Avaliação dos efeitos vasculares do sildenafil na aterosclerose experimental

Camille de Moura Balarini

Tese de doutorado em Ciências Fisiológicas

Doutorado em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, maio de 2013

Avaliação dos efeitos vasculares do sildenafil na aterosclerose experimental

Camille de Moura Balarini

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, maio de 2013

Avaliação dos efeitos vasculares do sildenafil na aterosclerose experimental

Camille de Moura Balarini

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em _____ por:

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez (UFES)
Orientador

Membro Externo

Membro Externo

Membro Interno

Membro Interno

Profa. Dra. Ivanita Stefanon (UFES)
Coordenadora da Pós-Graduação

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, maio de 2013

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa do meu desenvolvimento profissional (e pessoal) foi cumprida e não teria sido viável sem ajuda. Agradeço a todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. De maneira especial, gostaria de agradecer aos que se seguem.

Meus pais, Marluza e Ilson, por todo o apoio e incentivo necessários durante todos esses anos. Obrigada por investirem seus recursos na minha educação e por acreditarem que o conhecimento é o maior legado que se pode deixar para a prole. Muito obrigada pela paciência nos momentos de estresse! Espero, à partir de agora, poder retribuir o suporte que me foi dado durante todo esse tempo...

À minha irmã, Michelle e ao Marcos, meu cunhado, agradeço por compartilharem a maior parte desta caminhada, mesmo que distantes fisicamente. Muito obrigada pela torcida de sempre, pela sinceridade, pela companhia e pela diversão, claro!

Rodrigo, agradeço especialmente a você por segurar a barra sempre, por não me deixar desistir, embora a tentação tenha surgido, especialmente quando se vive num país que não valoriza a educação e a meritocracia. Obrigada por ser meu companheiro de luta contra o "jeitinho brasileiro"!

Ao professor Vasquez, agradeço por ser meu mentor intelectual desde sempre. Fico extremamente feliz a cada vez que estufo o peito para dizer que sou sua aluna e escuto sempre o mesmo comentário "Prof. Vasquez? Conheço... ele é excelente!". Além da orientação científica, sou extremamente grata por seus conselhos e pelas tentativas de me fazer perceber que cada coisa acontece a seu tempo. Espero continuar tendo o privilégio de trabalhar com o senhor. Como sempre diz, parafraseando outro grande cientista: "Cientistas de segunda categoria não formam cientistas de primeira categoria". Espero me tornar uma cientista de primeira categoria para honrar seu legado e sua filosofia de vida profissional.

À professora Silvana, que sempre diz que o laboratório é nossa segunda casa, agradeço por fazer o papel de "mãe" e colocar a gente nos eixos. Com certeza, meu método de trabalho sempre terá grande influência sua. Obrigada por todo o carinho e pelos exemplos, que certamente serão seguidos.

Às professoras Ágata e Isabele, agradeço o apoio técnico, psicológico e emocional. Vocês são pessoas muito queridas!

Ao pessoal do laboratório agradeço por compartilharem intimamente cada momento, bom ou mau: experimentos excelentes e fracassados, biotério, desespero na véspera do deadline, artigos publicados, café depois do almoço, happy hour na

primeira sexta feira depois da bolsa... Aos amigos "de fora", muito obrigada pela paciência nos momentos de ausência.

Aos professores da banca, titulares e suplentes, agradeço imensamente a disponibilidade de vir acompanhar o encerramento desta etapa e as sugestões proferidas. Aos professores de outros laboratórios e instituições, agradeço por cada contribuição em congressos, por email, telefone ou ao vivo, algumas vezes mesmo sem me conhecer. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho!

Agradeço sinceramente ao apoio técnico dos funcionários do PPGCF e dos componentes (professores, alunos e técnicos) dos laboratórios multiusuários envolvidos no trabalho, sobretudo LHMI e Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Redins.

Um agradecimento caloroso deve ser dado aos apoiadores financeiros, sem os quais este trabalho não seria viável: CAPES, CNPq, FAPES, Bioclin.

Por fim, agradeço especialmente à Universidade Federal do Espírito Santo, por me abrigar durante 16 anos (mais da metade do meu tempo de vida atual!). Eu cresci dentro desta Universidade e este ambiente me é muito familiar e agradável. Com certeza as memórias da EPG UFES, do curso de Farmácia e Bioquímica e do PPGCF se manterão em minha mente e serão sempre lembradas com muito carinho.

"When you wish upon a star/makes no difference
who you are/anything your heart desires/will come
to you/If your heart is in your dreams/no request is
to extreme/when you wish upon a star/as dreamers
do"

(Leigh Harline, Ned Washington)

"Aprendamos a sonhar, senhores, pois então talvez
nos apercebamos da verdade."

(August Kekulé)

"E apliquei o meu coração a conhecer a sabedoria
e a conhecer os desvarios e as loucuras, e vim a
saber que também isto era aflição de espírito.
Porque na muita sabedoria há muito enfado; e o
que aumenta em conhecimento, aumenta em dor."

(Eclesiastes 1:17-8)

RESUMO

A disfunção endotelial é uma condição *sine qua non* ao desenvolvimento da aterosclerose. Experimentalmente, pode ser demonstrada pelo comprometimento do relaxamento dependente do endotélio à acetilcolina (ACh), o qual envolve a sinalização da via óxido nítrico/GMP cíclico (NO/cGMP). Deste modo, agentes farmacológicos que sejam capazes de potencializar a ação do NO são considerados estratégias promissoras para melhora da função vascular e redução da aterosclerose. Dentre tais agentes, destaca-se o sildenafil, uma vez que inibe a enzima fosfodiesterase 5 (PDE5), responsável por degradar o cGMP, o principal segundo mensageiro do NO. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos vasculares do sildenafil na aterosclerose experimental. Utilizou-se camundongos machos, das linhagens C57BL/6 (CT) e nocautes para a apolipoproteína E (apoE^{-/-}), os quais receberam dieta aterogênica à partir de 8 semanas de vida, durante as 10 semana subsequentes. Os camundongos apoE^{-/-} foram divididos em 2 grupos: animais tratados, que receberam citrato de sildenafil por via oral durante 3 semanas (40mg/Kg/dia, n=3-10) e veículos, que receberam apenas veículo (n=3-10). Os animais CT foram usados como controles. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e tiveram a aorta torácica removida e cortada em anéis para estudos de função vascular. A função vascular foi avaliada por meio da construção de curvas concentração-resposta à ACh (100 pM – 30 µM) ou nitroprussiato de sódio (NPS, 10 pM – 30 µM), após pré-contracção com fenilefrina (Phe, 10 µM). Para avaliar a influência do NO e das espécies reativas de oxigênio (ROS) na resposta vasodilatadora, os anéis foram pré-incubados com L-NAME (100 µM) ou apocinina (300 µM), respectivamente. Em um grupo diferente, após o fim o tratamento os animais tiveram suas aortas retiradas e processadas para avaliação histológica da deposição de placa aterosclerótica (coloração com Oil Red), produção de ROS (marcação com dihidroetídeo - DHE) e de NO (marcação com diaminofluoresceína - DAF). As respostas vasodilatadoras estão expressas como percentual de relaxamento em relação ao valor da pré-contracção. A resposta máxima (R_{máx}) e o log da dose de droga que provocou metade da resposta máxima (EC₅₀) foram calculados. Resultados de bloqueios farmacológicos foram expressos como a diferença na área abaixo da curva na presença e ausência do inibidor (dAUC). Os resultados estão expressos como média ± EPM. As comparações

estatísticas foram feitas por ANOVA, seguida do *post hoc* de Tuckey. * $p < 0.05$ ou ** $p < 0.01$ vs. CT; # $p < 0.05$ ou ### $p < 0.01$ vs. apoE^{-/-} veículo; § $p < 0,05$ ou §§ $p < 0,01$ vs. mesmo grupo sem bloqueio. Os animais apoE^{-/-} demonstraram marcante disfunção endotelial ($R_{\text{máx}}$: $66 \pm 9,7^*$ e pEC_{50} : $6,1 \pm 0,1^{**}$) quando comparados aos controles ($R_{\text{máx}}$: $87 \pm 3,6$ e pEC_{50} : $7,3 \pm 0,1$), a qual foi revertida pelo tratamento com sildenafil ($R_{\text{máx}}$: $95 \pm 3,1^{\#}$ e pEC_{50} : $7,2 \pm 0,3^{##}$). Tal disfunção não se deve à redução da sensibilidade do músculo liso vascular ao NO, uma vez que não foram observadas diferenças nas respostas ao NPS. O papel do NO na vasodilatação à ACh em animais apoE^{-/-} estava diminuído (dAUC: $58,3 \pm 16,8^{**}$ vs. CT: $230 \pm 10,6$) e foi restabelecido nos animais tratados ($233 \pm 10,2^{##}$). Ainda, a influência das ROS na vasodilatação reduzida dos animais apoE^{-/-} foi revertida pelo sildenafil (CT $R_{\text{máx}}$: $84 \pm 5,2$ e pEC_{50} : $7,3 \pm 0,2$; apoE^{-/-} $R_{\text{máx}}$: $101 \pm 4,6^{\S\S}$ e pEC_{50} : $7,3 \pm 0,2^{\S\S}$; apoE^{-/-} sildenafil $R_{\text{máx}}$: $94 \pm 3,7$ e pEC_{50} : $7,2 \pm 0,2$). A análise da deposição de placa aterosclerótica revelou marcante deposição de placa nos apoE^{-/-} quando comparados aos animais CT ($37,7 \pm 3,4^{**}$ vs. $0,4 \pm 0,4\%$) e que houve uma redução de aproximadamente 40% na deposição de placa nos animais apoE^{-/-} tratados com sildenafil ($37,7 \pm 3,4$ vs. $21,3 \pm 5,0^{\#}$). Ainda, observou-se que mesmo os animais controle apresentam um nível basal de produção de espécies reativas de oxigênio ($2,25 \pm 0,12$). Nos animais apoE^{-/-} veículo, houve um aumento do estresse oxidativo ($3,47 \pm 0,41^*$), o qual foi revertido aos níveis do controle pelo tratamento com sildenafil ($2,42 \pm 0,21^{\#}$). Os camundongos ateroscleróticos que receberam veículo apresentaram redução da produção de NO quando comparados aos controles normocolesterolêmicos ($38 \pm 5,2$ vs. $17,8 \pm 1,2^*$). O tratamento crônico com sildenafil foi capaz de reverter completamente este quadro nos animais ateroscleróticos ($17,8 \pm 1,2$ vs. $38,2 \pm 6,8^{\#}$). Desta maneira, é possível concluir que o tratamento com sildenafil melhora a função endotelial na aterosclerose experimental. Os mecanismos envolvidos nesta resposta não envolvem o incremento da sensibilidade do músculo liso vascular ao NO, mas sim o restabelecimento do NO na vasodilatação dependente do endotélio, provavelmente devido ao incremento da biodisponibilidade desta molécula por conta do estresse oxidativo reduzido e do aumento de sua produção. A melhora na função vascular se reflete na redução da deposição de placa aterosclerótica em aorta.

Palavras-chave: aterosclerose, disfunção endotelial, óxido nítrico, sildenafil.

ABSTRACT

Endothelial dysfunction is a *sine qua non* condition to the development of atherosclerosis. Experimentally, this can be demonstrated by an impaired endothelium-dependent vasodilator response to acetylcholine (ACh) that involve nitric oxide (NO). Thus, pharmacological agents that potentiate NO action are considered promising strategies to improve vascular function and reduce atherosclerosis. Among these agents, sildenafil appears to be a good option, once it inhibits phosphodiesterase 5, the enzyme responsible for degrade cGMP, the most important second messenger of NO. So, the aim of this study was to test if sildenafil can ameliorates endothelial dysfunction in experimental atherosclerosis. Male wild-type C57BL/6 (WT) and apolipoprotein E knockout (apoE^{-/-}) mice, which received Western-type diet, were used. ApoE^{-/-} were divided in two groups: treated animals, which received orally sildenafil citrate (40 mg/Kg/day, n=3-10), and vehicle animals, which received vehicle only (n=3-8); WT animals (n=3-10) were used as controls. At the end of treatment, animals were euthanized and had the thoracic aorta removed. Rings were mounted for vascular studies. Vascular function was accessed by concentration-responses curves to cumulative concentrations of ACh (100 pM – 30 µM) or sodium nitroprusside (SNP; 10 pM – 30 µM) , after pre-contraction with phenylephrine (10 µM). To test the influence of NO and reactive oxygen species (ROS) in relaxation responses, rings were pre-incubated with L-NAME (100 µM) or apocynin (300 µM), respectively. In a different set of animals, after the experimental period, mice had their aorta excised and processed to histological evaluation of plaque deposition (dye with Oil Red), ROS production (label with dihydroethidium - DHE) and NO (label with diaminofluorescein - DAF). Responses were expressed as the percentage of dilation relative to the maximal pre-contraction. The maximum effect (R_{max}) and the log of the dose of agonist that produced half of R_{max} (log EC₅₀) were calculated. Results of pharmacological blockage were expressed as differences in the area under the concentration-responses curves (dAUC) with and without blockage. Values are expressed as means ± SEM. Statistical comparisons were done by ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. Values of *p<0.05 or **p<0.01 vs. WT; #p<0.05 or ###p<0.01 vs. apoE^{-/-} vehicle and §p<0.05 or §§p<0.01 vs. the same group without blockage were regarded as statistically significant. ApoE^{-/-} animals showed markedly vascular dysfunction (R_{max}: 66±9.7* e pEC₅₀: 6.1±0.1**) when

compared to WT (R_{\max} : 87 ± 3.6 e pEC_{50} : 7.3 ± 0.1), which was reversed by sildenafil treatment (R_{\max} : $95 \pm 3.1^{\#}$ e pEC_{50} : $7.2 \pm 0.3^{###}$). This dysfunction was not due to reduction in vascular smooth muscle sensitivity to NO, once no differences were found in SNP responses. The role of NO in relaxation of apoE^{-/-} was diminished (dAUC: $58.3 \pm 16.8^{**}$ vs. WT: 230 ± 10.6) but was restored by sildenafil ($233 \pm 10.2^{##}$). Also, the influence of ROS in reduced vasodilation of apoE^{-/-} was reversed by sildenafil (CT R_{\max} : 84 ± 5.2 e pEC_{50} : 7.3 ± 0.2 ; apoE^{-/-} R_{\max} : 101 ± 4.6^{SS} e pEC_{50} : 7.3 ± 0.2^{SS} ; apoE^{-/-} sildenafil R_{\max} : 94 ± 3.7 e pEC_{50} : 7.2 ± 0.2). Atherosclerotic plaque evaluation revealed a markedly plaque deposition in aorta of apoE^{-/-} when compared to WT ($37.7 \pm 3.4^{**}$ vs. $0.4 \pm 0.4\%$). There was a reduction of 40% in plaque deposition in apoE^{-/-} mice which received sildenafil (37.7 ± 3.4 vs. $21.3 \pm 5.0^{\#}$). Also, even in control group, a basal level of ROS production was observed (2.25 ± 0.12). In apoE^{-/-} animals there was a increase in oxidative stress ($3.47 \pm 0.41^*$), which was restored to the control levels by sildenafil treatment ($2.42 \pm 0.21^{\#}$). Atherosclerotic animals treated with vehicle showed a reduction in NO production when compared to WT (38 ± 5.2 vs. $17.8 \pm 1.2^*$). Chronic sildenafil treatment was able to revert this situation (17.8 ± 1.2 vs. $38.2 \pm 6.8^{\#}$). Thus, sildenafil treatment restores endothelial function in experimental atherosclerosis. The mechanisms involved in this response do not involve increase in sensitivity of vascular smooth muscle to NO, but rather restores NO role in endothelium-dependent dilation, probably due to increase in bioavailability of this molecule due to reduced oxidative stress and increased NO production. This amelioration in endothelial function reflects on reduced atherosclerotic plaque deposition in aorta.

Key words: atherosclerosis, endothelial dysfunction, nitric oxide, sildenafil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Taxa de internação hospitalar.....	19
Figura 2: Aterogênese.....	22
Figura 3: Produção de NO e de outras substâncias vasoativas pelo endotélio.....	24
Figura 4: Efeitos do uso diário de inibidores da PDE5 no endotélio.....	28
Figura 5: Perfil lipídico plasmático em camundongos.....	31
Figura 6: Relação entre dieta, hipercolesterolemia, idade e disfunção endotelial...	32
Figura 7: Representação esquemática do protocolo de tratamento utilizado.....	40
Figura 8: Sistema para estudo de reatividade de anéis de aorta.....	41
Figura 9: Avaliação da viabilidade dos anéis.....	42
Figura 10: Avaliação da integridade do endotélio.....	42
Figura 11: Curva dose-resposta à substância vasodilatadora.....	43
Figura 12: Curvas dose-resposta à acetilcolina.....	50
Figura 13: Curvas dose-resposta à acetilcolina após inibição com L-NAME.....	51
Figura 14: Curvas dose-resposta à acetilcolina após inibição com apocinina.....	53
Figura 15: Curvas dose-resposta ao nitroprussiato de sódio.....	54
Figura 16: Ativação basal da cascata NO/cGMP.....	55
Figura 17: Representação gráfica da deposição de placa aterosclerótica.....	56
Figura 18: Representação gráfica da marcação com DHE na aorta.....	57
Figura 19: Representação gráfica da marcação com DAF na aorta.....	58
Figura 20: Microscopia eletrônica de varredura.....	59
Figura 21: Mecanismos intracelulares de desacoplamento da eNOS.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil lipídico plasmático e dados ponderais dos animais controle.....	48
Tabela 2. Eficácia e sensibilidade a agentes vasoativos em aorta.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AA: Ácido araquidônico
AC: Adenilato ciclase
ACh: Acetylcholine
ADMA: Asymmetric dimethyl arginine
AngII: Angiotensina II
ANOVA: Análise de variância
ApoE: Apolipoproteína E
ApoE^{-/-}: Camundongo deficiente em apolipoproteína E
AT1R: Receptor para angiotensina tipo 1
ATP: Adenosina trifosfato
BH4: 5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina
cAMP: Adenosina monofosfato cíclico
CETP: Cholesteryl ester transfer protein
CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
cGMP: Guanosina monofosfato cíclico
COX: Ciclooxygenase
CRP: Proteína C reativa
CT: Animais controle da linhagem C57BL/6
CTNBIO: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DAF: Diaminofluoresceína
DAF-2DA: Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína
DAF-2T: Triazolofluoresceína
DATASUS: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
dAUC: Diferença entre as áreas abaixo da curva
DCV: Doenças cardiovasculares
DHE: dihidroetidina
EDHF: Endothelial-derived hyperpolarizing factor
EET: Ácidos epoxieicosatrienoicos
EMESCAM: Escola de Superior da Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória
eNOS: Endothelial nitric oxide synthase
EPM: Erro padrão da média

GC: Guanilato cicase
GTP: Guanosina trifosfato
HDL: High density lipoproteins
ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1
IDL: Intermediate density lipoproteins
IFN γ : Interferon gamma
IL-6: Interleucina 6
iNOS: Inducible nitric oxide synthase
L-arg: L-arginina
LDL: Low density lipoproteins
L-NAME: N-G-nitro-L-arginina metil ester
L-NNA: N-G-nitro-L-arginina
log EC₅₀: Log da dose de agonista que produziu metade da resposta máxima
MEV: Microscopia eletrônica de varredura
MS: Ministério da Saúde
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NIH: National Institute of Health
NO: Óxido nítrico
NOS: Nitric oxide synthase
NPS: Nitroprussiato de sódio
nNOS: Neuronal nitric oxide synthase
•O₂⁻: Radical superóxido
ONOO⁻: Peroxinitrito
oxLDL: LDL oxidado
PBS: Phosphate buffered saline
PDE: fosfodiesterase
PDE5: fosfodiesterase 5
pEC₅₀: -logEC₅₀
PGI₂: Prostaglandina I₂
Phe: phenylephrine
PK: Proteínas kinase
PKG: Proteína kinase G
QM: quilomícrons
R_{máx}: Resposta máxima

ROS: Reactive oxygen species

SBC: Sociedade Brasileira de Cardiologia

sGC: Guanilato ciclase solúvel

SNP: Sodium nitroprusside

SOD: Superóxido dismutase

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1

VLDL: Very low density lipoproteins

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Doenças Cardiovasculares.....	19
1.2 Função Endotelial e Aterosclerose.....	20
1.3 Óxido Nítrico.....	23
1.4 GMP cíclico e Fosfodiesterase.....	26
1.5 Inibidores de Fosfodiesterase.....	27
1.6 Modelos Experimentais de Disfunção Endotelial e Aterosclerose.....	29
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivos Gerais.....	37
3.2 Objetivos Específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Animais Experimentais.....	39
4.2 Grupos Experimentais.....	39
4.3 Análises Bioquímicas.....	40
4.4 Estudos de Função Vascular.....	40
4.4.1 Avaliação da Viabilidade dos Anéis e Teste do Endotélio.....	41
4.4.2 Protocolos de Reatividade Vascular.....	43
4.5 Histologia Vascular.....	44
4.5.1 Coloração com Oil Red.....	44
4.5.2 Marcação com DHE.....	45
4.5.3 Marcação com DAF.....	45
4.5.4 Microscopia Eletrônica.....	46
4.6 Análise Estatística.....	46
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Perfil Lipídico Plasmático e Dados Ponderais.....	48
5.2 Reatividade Vascular.....	49
5.2.1 Relaxamento à Acetilcolina.....	49
5.2.2 Papel do Óxido Nítrico no Relaxamento Vascular à Acetilcolina.....	50
5.2.3 Papel do Estresse Oxidativo no Relaxamento Vascular à Acetilcolina.....	52
5.2.4 Resposta do Músculo Liso Vascular ao Óxido Nítrico.....	54
5.2.5 Ativação Basal da Cascata NO/cGMP.....	54
5.3 Deposição de Placa Aterosclerótica.....	55

5.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	56
5.5 Produção de Óxido Nítrico.....	57
5.6 Integridade do Endotélio.....	58
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXO I Publicação Resultante deste Trabalho.....	89
ANEXO II Premiações deste Trabalho.....	97
ANEXO III Recursos Obtidos com este Projeto.....	99

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares representam um problema internacional de saúde pública e ainda constituem a principal causa de morte no mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, mais de 30% dos óbitos registrados no ano de 2008 em todo o mundo foram devidos a diversas formas de eventos cardiovasculares (WHO, 2011).

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, elevações rápidas e substanciais no número de mortes por causas cardiovasculares tem sido observadas nos últimos 30 anos (SBC, 2007). Estima-se que, em média, 300 mil pessoas morrem anualmente no Brasil devido a doenças cardiovasculares, o que significa uma morte a cada 2 minutos (SBC, 2012). As internações por doenças do aparelho circulatório estão entre as principais causas de hospitalização por doenças crônicas não transmissíveis e geram alto custo para o sistema de saúde brasileiro (figura 1, MS, 2011).

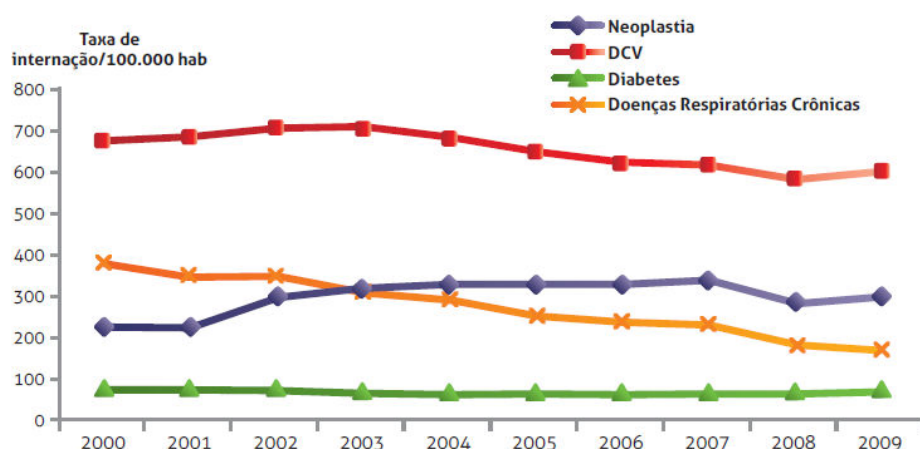


Figura 1: Taxa de internação hospitalar. DCV: Doenças cardiovasculares. (Fonte: MS, 2011).

Grande parte dos óbitos decorrentes de eventos cardiovasculares pode ser atribuída à aterosclerose e suas complicações. A principal delas, infarto agudo do miocárdio, respondeu por 45% das mortes decorrentes de doenças do aparelho circulatório em 2008 (DATASUS, 2008).

A aterosclerose pode ser definida como um processo crônico, progressivo e sistêmico, caracterizado por uma resposta inflamatória e fibroproliferativa da parede arterial, causada por agressões à sua superfície (Ross 1999; Da Luz e Uint, 2003).

Uma vez que estudos epidemiológicos fornecem provas irrefutáveis da relação entre dieta e aterogênese, a prevenção de doenças relacionadas ao estilo de vida, como infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais surge como uma tarefa importante e urgente em países em desenvolvimento (Aoki et al., 2006).

1.2 Função Endotelial e Aterosclerose

O endotélio vascular constitui-se de uma camada única de células, presente na superfície luminal de todo o sistema vascular (Bryan et al., 2005). Até meados da década de 80, acreditava-se que o endotélio era tão somente uma barreira entre o sangue e os vasos. A partir de estudos publicados por Furchgott, tornou-se claro que o endotélio é essencial na modulação do tônus vascular, atuando de maneira ativa por meio da regulação da liberação e metabolismo de mediadores vasoativos (Furchgott & Zawadzki, 1980; Higashi et al., 2009).

Se todo o endotélio do corpo pudesse ser coletado, seu peso seria igual ao do fígado e sua extensão equivalente a seis quadras de tênis. Pode-se considerar, então, o endotélio como o maior órgão endócrino do corpo humano (Higashi et al., 2009). Ocupando uma posição estratégica entre o sangue circulante e os tecidos e apresentando a habilidade de responder a mudanças nos componentes físicos, químicos e humorais do ambiente em que se encontra por meio da produção de substâncias biologicamente ativas, o endotélio normal modula o tônus do músculo liso subjacente, mantém a superfície luminal não adesiva e medeia a hemostasia, a proliferação celular e processos imunes e inflamatórios na parede vascular (Rubanyi, 1993).

Em resposta a diversos estímulos, as células endoteliais alteram suas propriedades, visando à manutenção do equilíbrio vascular. Normalmente, as alterações fenotípicas das células são transientes e não comprometem o reestabelecimento da função endotelial. Contudo, em algumas situações patológicas, como na aterosclerose, a função endotelial é cronicamente comprometida, um passo crucial ao estabelecimento da doença (Ribeiro et al., 2009).

Dentre as principais moléculas vasodilatadoras produzidas pelo endotélio podem-se destacar o óxido nítrico (NO), a prostaciclina ou prostaglandina I₂ (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (*endothelium-derived hyperpolarizing factor* – EDHF), cuja estrutura ainda não está plenamente estabelecida (Bryan et al.,

2005; Mitchell et al., 2008; Vanhoutte, 2009). Além disso, o endotélio é responsável pela produção de agentes vasoconstrictores (endotelina 1, angiotensina II, tromboxano A2), antitrombóticos (NO, PGI₂, fator de crescimento transformador beta), protrombóticos (endotelina 1, espécies reativas de oxigênio, tromboxano A2, fibrinogênio, fator tecidual), antiproliferativos (NO, PGI₂, fator de crescimento transformador beta, sulfato de heparina) e proliferativos (endotelina 1, angiotensinogênio, espécies reativas de oxigênio, fator de crescimento plaquetário, fator de crescimento de fibroblasto) (Da Luz e Uint, 2003).

A disfunção endotelial pode, dessa maneira, ser definida como o desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e fatores constritores, pró e anticoagulantes ou inibidores e promotores de crescimento (Rubanyi, 1993). Considera-se que a injúria de células endoteliais é uma condição *sine qua non* para aterogênese (De Meyer & Herman, 1997). Na verdade, o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas compreende uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas, descritas em seu conjunto como uma doença inflamatória (Ross, 1999). Devido ao fato de a hipercolesterolemia estar entre os principais fatores de risco para aterogênese, a aterosclerose tem sido considerada como o acúmulo de grande quantidade de lipídios na parede arterial. O processo de desenvolvimento da placa de ateroma, contudo, é muito mais complexo (Ross, 1999).

Conforme o curso do processo aterogênico exemplificado na figura 2, inicialmente ocorre uma lesão endotelial, sobretudo em locais onde o fluxo sanguíneo é turbilhonar e favorece o estresse de cisalhamento sobre a parede arterial (ou *shear stress*). Há redução da biodisponibilidade do principal vasodilatador produzido pelo endotélio (NO), caracterizando a disfunção endotelial. O endotélio disfuncional tem sua permeabilidade alterada, o que favorece a penetração de colesterol, principalmente carregado em lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein* – LDL) (Da Luz e Uint, 2003).

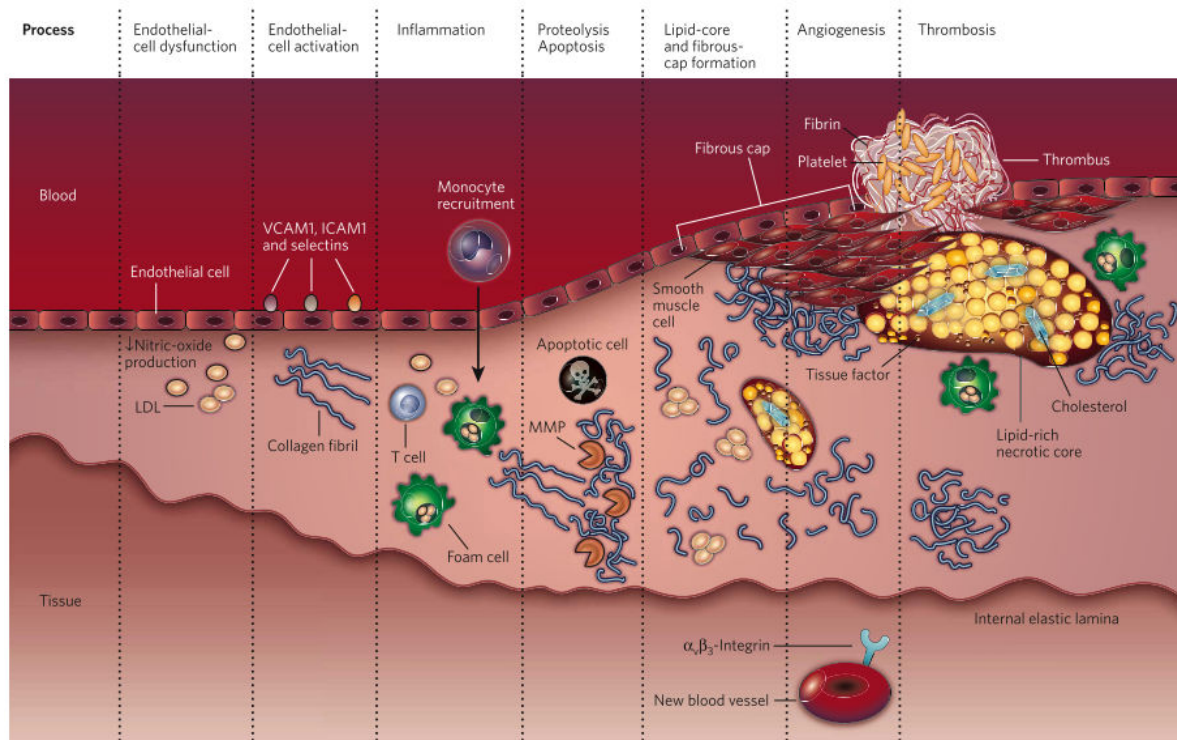


Figura 2: Aterogênese. Adaptado de Sanz e Fayad, 2008.

A expressão de moléculas de adesão pelo endotélio é regulada por citocinas sintetizadas em pequenas concentrações e cuja produção é estimulada na vigência de disfunção endotelial (principalmente interleucinas 1, 4 e 6, fator de necrose tumoral alfa – TNF α e interferon gama – IFN γ). Neste caso, ocorre aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial, sobretudo molécula de adesão celular vascular (*vascular cell adhesion molecule* – VCAM-1), molécula de adesão intercelular (*intercellular adhesion molecule* – ICAM-1) e E-selectina. Esse fenômeno favorece a adesão e consequente migração de leucócitos circulantes (mais especificamente linfócitos T e macrófagos) para o espaço subendotelial (Libby, 2002; Da Luz e Uint, 2003).

Em contato com células responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), tais como células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas, as partículas de LDL são oxidadas progressivamente e passam a ser reconhecidas por receptores *scavenger* na superfície de macrófagos. Desta maneira, ocorre a fagocitose e acúmulo de grandes quantidades de lipídios por essas células, tornando-as células espumosas (Da Luz e Uint, 2003).

A redução de NO, em consequência à disfunção endotelial, também está relacionada ao favorecimento da proliferação celular, por se tratar de um importante fator antiproliferativo. No curso da aterogênese, há a migração e proliferação de células musculares lisas, as quais produzem matriz extracelular e contribuem para o aumento da placa e obstrução da luz do vaso, podendo acarretar processos isquêmicos. Além disso, a disfunção endotelial favorece a trombogênese, que pode gerar êmbolos, os quais migram para vasos de menor calibre, levando a isquemia e infarto tecidual (Da Luz e Uint, 2003).

1.3 Óxido Nítrico

Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram a obrigatoriedade da presença do endotélio íntegro para a promoção da vasodilatação induzida por acetilcolina. Anos depois, identificou-se que esse fator relaxante derivado do endotélio era, na verdade, o NO (Furchgott, 1999).

O NO é um radical livre, volátil e com tempo de meia vida curto (Wever et al., 1998), sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina à L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase* – NOS). Essa enzima apresenta duas isoformas constitutivas: endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), além de uma isoforma induzível (iNOS) (Rudolph & Freeman, 2009). A atividade enzimática satisfatória requer a enzima em sua forma dimérica e a participação de co-fatores, tais como cálcio, calmodulina, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e 5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina (BH4) e pode ser inibida endogenamente por um metabólito da L-arginina: dimetil arginina assimétrica (*asymmetric dimethyl arginine* – ADMA, figura 3) (Förstermann & Sessa, 2012; Vanhoutte, 2009).

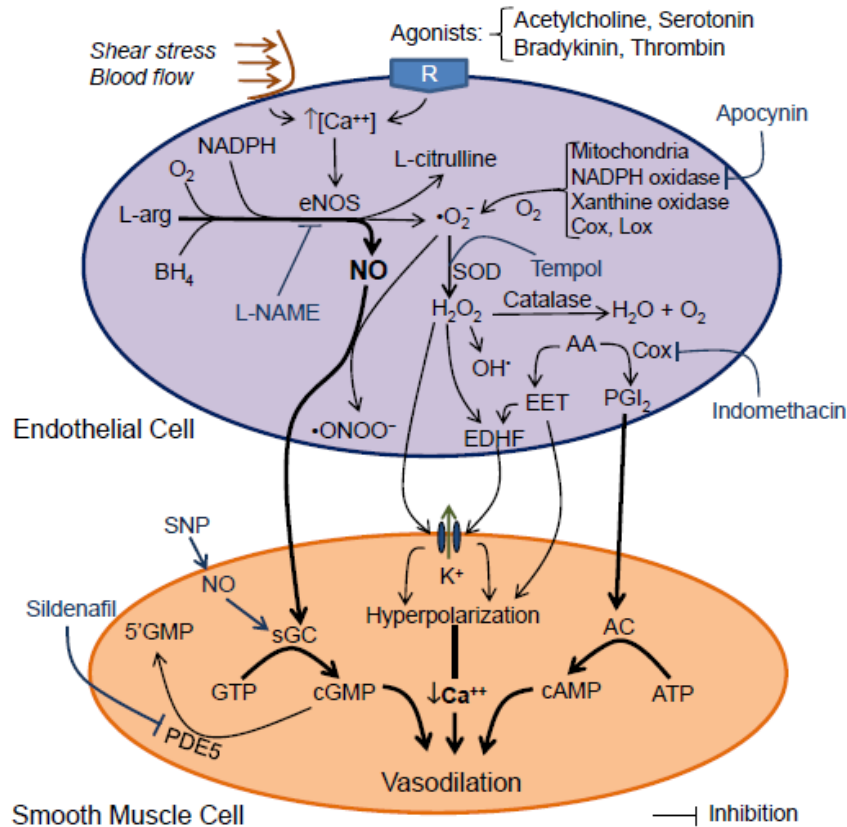


Figura 3: representação esquemática da produção de NO e de outras substâncias vasoativas pelo endotélio em condições fisiológicas. As setas grossas indicam as vias preponderantes (Meyrelles et al., 2011).

Assim que é liberado pelo endotélio, o NO difunde-se para o lado luminal do vaso, onde inibe a adesão e agregação plaquetária, aumentando a fluidez do sangue e prevenindo a trombose. O NO também se difunde para a região subendotelial, onde induz a dilatação do músculo liso vascular e inibe o remodelamento e a proliferação de células musculares lisas (Mitchell et al., 2008).

O mecanismo de ação intracelular do óxido nítrico no músculo liso inclui a ativação da isoforma solúvel da enzima guanilato ciclase (sGC), por meio da alteração conformacional induzida pela formação do intermediário ferro-nitrosil no grupamento ferro-heme da enzima (figura 3) (Rudolph & Freeman, 2009). A ativação da sGC induz a produção de guanosina monofosfato cíclico (*cyclic guanine monophosphate* – cGMP). O cGMP promove ativação da proteína kinase G (PKG), o que leva à redução do conteúdo intracelular de cálcio, com consequente vasodilatação (Moncada & Higgs, 1993). Apesar de estar bem estabelecido que o incremento de cGMP é o principal mecanismo de ação intracelular do NO, em

algumas situações, este também pode promover a abertura de canais de potássio, levando à vasodilatação (Mitchell et al., 2008).

Experimentalmente, a função endotelial pode ser inferida através da resposta vasodilatadora em vasos ou leitos isolados frente acetilcolina (*acetylcholine* - ACh) ou substâncias que induzem a liberação de NO após uma pré-contracção farmacológica. Diversos estudos demonstraram o prejuízo na biodisponibilidade de NO em situações de disfunção endotelial como, por exemplo, a aterosclerose (De Meyer & Herman, 1997).

A hipercolesterolemia, principal fator de risco ao desenvolvimento de aterosclerose, constitui-se em uma situação patológica na qual a biodisponibilidade de NO está diminuída, seja por redução de sua síntese devido ao comprometimento da expressão ou atividade da enzima eNOS (Liao et al., 1995; d'Uscio et al., 2001) ou pelo incremento da inativação do NO pelo ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) (Harrison & Ohara, 1995; Ohara et al., 1993; Wever et al., 1998).

O metabolismo do celular do oxigênio leva à produção de moléculas altamente instáveis, as espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS). Em condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a quantidade de ROS formada e a quantidade metabolizada ou eliminada. Em situações patológicas, há um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, resultando no fenômeno conhecido como estresse oxidativo (Touyz, 2004). Particularmente, o $\cdot\text{O}_2^-$ pode reagir com o NO formando peroxinitrito (ONOO^-), cuja difusibilidade e capacidade de relaxamento do músculo liso é inferior ao observado para o NO. Desta maneira, em situações de estresse oxidativo, a biodisponibilidade do NO para exercer suas ações fica comprometida (Pacher et al., 2007).

Ensaio clínicos demonstraram que, mesmo em voluntários saudáveis, a ingestão de uma refeição rica em lipídios é suficiente para promover uma disfunção endotelial transitória (Vogel et al., 1997). Em animais experimentais, foi descrita redução da biodisponibilidade de NO devido tanto ao incremento de sua inativação pelo $\cdot\text{O}_2^-$, quanto ao comprometimento de sua síntese devido ao aumento de ADMA, inibidor da enzima NOS (Aoki et al., 2006).

Além de constituir o principal marcador de disfunção endotelial (o primeiro passo para a aterogênese), a redução da biodisponibilidade de NO repercute diretamente no processo de estabelecimento da lesão ateromatosa. Evidências indicam que o NO inibe a adesão de monócitos, agregação plaquetária, proliferação

de células musculares lisas e atividade de enzimas oxidantes (Aoki et al., 2006; Li W et al., 2005; Niebauer et al., 1999; Wever et al., 1998).

1.4 GMP cíclico e Fosfodiesterase

O cGMP regula diversas respostas fisiológicas, como o tônus vascular, secreção intestinal e fototransdução retiniana e exerce seus efeitos por meio da ativação de diferentes efetores, tais como proteínas quinase (PK) mediadas por cGMP, canais iônicos dependentes de cGMP e fosfodiesterases (PDEs) (De Melo, 2005). No músculo liso, diversos processos metabólicos e mecânicos são regulados por cGMP, normalmente de maneira bem rápida, sendo o tônus contrátil do músculo o melhor exemplo de como isso acontece. Mudanças lentas reguladas por esse mesmo nucleotídeo cíclico incluem o controle da proliferação celular em resposta a injúrias (Rybalkin et al., 2003).

A amplitude e duração da sinalização mediada por cGMP depende da relação entre as taxas de produção e degradação (Rybalkin et al., 2003). Sua produção se dá a partir da ativação da enzima guanilato ciclase (GC), que converte trifosfato de guanosina (GTP) em cGMP. Há duas isoformas de GC presentes em diversos tecidos: a particulada, ligada à membrana celular e a solúvel (De Melo, 2005). Somente a forma solúvel é ativada pelo óxido nítrico, pois possui um domínio heme, no qual o NO forma o complexo ferro-nitrosil, ativando-a (Rudolph & Freeman, 2009).

A degradação do cGMP é dada por enzimas da família das PDEs, que compreendem um gama de enzimas que hidrolisam nucleotídeos cíclicos, de modo que são cruciais na modulação da sinalização citoplasmática desses segundo mensageiros (Raja & Nayak, 2004). Atualmente sabe-se que há 11 famílias de genes que expressam PDEs em tecidos de mamíferos e que são responsáveis pela síntese de diferentes isoformas de PDEs (PDE1 a PDE11, incluindo subtipos) (Rybalkin et al., 2003).

A PDE5 é específica para cGMP e está presente em grande concentração em um número limitado de tecidos: coração, músculo liso vascular sistêmico, corpo cavernoso do pênis, plaquetas e músculo liso visceral (Glossmann et al., 1999). Em condições basais, é a isoforma mais ativa na hidrólise de cGMP no músculo liso vascular (Rybalkin et al., 2003), podendo ser considerada como um dos principais reguladores da resposta muscular à ativação da cascata NO/cGMP.

A importância fisiológica da PDE5 na regulação do tônus do músculo liso tem sido demonstrada em estudos clínicos e experimentais que utilizam inibidores específicos desta enzima no tratamento da disfunção erétil (Bivalacqua et al., 2009) e remodelamento vascular (Koyama et al., 2001), embora ainda haja uma carência de estudos que visem elucidar a participação da PDE5 em patologias cardiovasculares.

1.5 Inibidores de Fosfodiesterase

Os inibidores das PDEs elevam os níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos. Devido à diversidade de isoformas e sua distinta distribuição pelos tecidos, inibidores seletivos para diferentes isoenzimas da família das fosfodiesterases tornam-se ferramentas farmacológicas promissoras. O sildenafil, descoberto em 1989, destaca-se neste panorama por apresentar alta seletividade à PDE5, responsável pela degradação do cGMP (Glossmann et al., 1999; Raja & Nayak, 2004).

Por meio da inibição da hidrólise do cGMP, o sildenafil prolonga sua ação, aumentando o relaxamento do músculo liso vascular em resposta à ativação da cascata NO/cGMP (Raja & Nayak, 2004; Rybalkin et al., 2003). A vantagem terapêutica da inibição de PDE5 sobre estratégias que aumentam os níveis de NO é que a primeira opção evita os riscos associados ao excesso de óxido nítrico. Em altas concentrações, o NO é citotóxico e atua via mecanismos independentes da ativação da guanilato ciclase, aumentando o estresse oxidativo, o que potencialmente favorece o desenvolvimento de doenças, como a aterosclerose (Rizzo et al., 2010; Takaya et al., 2007).

Clinicamente, observou-se que o sildenafil promove dilatação de coronárias epicárdicas, melhora a disfunção endotelial e inibe ativação plaquetária em pacientes com doença arterial coronariana (Halcox et al., 2002). Em pacientes diabéticos, o tratamento crônico com sildenafil foi capaz de melhorar a função endotelial e reduzir marcadores de inflamação vascular (ICAM, VCAM, IL-6 e proteína C reativa) (figura 4) (Aversa et al., 2008).

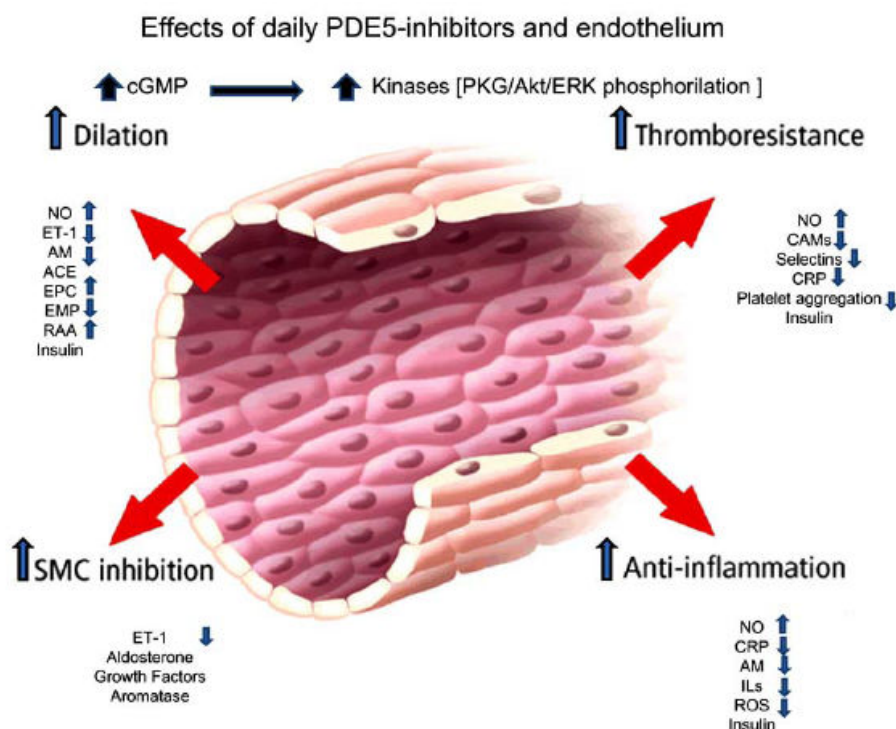


Figura 4: Efeitos do uso diário de inibidores da PDE5 no endotélio. Adaptado de Aversa et al. 2008.

Em animais experimentais, a inibição da PDE5 por meio do uso de sildenafil promoveu redução da peroxidação lipídica (uma forma tradicional de se avaliar o estresse oxidativo geral do organismo), além de aumento da capacidade antioxidante total em ratos diabéticos (Milani et al., 2005). Além disso, inibiu a formação de $\cdot\text{O}_2^-$ no corpo cavernoso de ratos hipercolesterolêmicos, com consequente melhora do relaxamento do músculo liso, mesmo na deficiência de produção de NO endógeno (Shukla et al., 2005).

Por outro lado, demonstrou-se que o ONOO^- pode compensar, em parte, a redução da biodisponibilidade de NO, promovendo relaxamento vascular por meio da elevação dos níveis intracelulares de cGMP (Li J et al., 2005). De maneira bastante interessante, a inibição da PDE5 resulta não apenas em incremento do sinal mediado pelo NO residual, mas também na amplificação da vasodilatação induzida pelo ONOO^- (Schäfer et al., 2008).

Nenhum fármaco usado atualmente no quadro de doenças cardiovasculares foi originalmente desenvolvido tendo como alvo o tratamento da disfunção endotelial. Estudos demonstraram que algumas das terapias mais utilizadas (como, por exemplo, os inibidores de enzima conversora de angiotensina), podem promover

certo grau de proteção ao endotélio (Rubanyi, 1993). Neste âmbito, a utilização de inibidores da PDE5 surge como uma opção promissora para tratamento de disfunção endotelial e consequente redução do risco de desenvolvimento de aterosclerose. Contudo, os efeitos dos inibidores da PDE5 em vasos de grande calibre (sistema de condutância), os quais são os mais afetados pela aterosclerose, ainda não foram suficientemente investigados, sobretudo em modelos experimentais de aterosclerose.

1.6 Modelos Experimentais de Disfunção Endotelial e Aterosclerose

Os lipídeos são transportados no plasma em complexos solúveis denominados lipoproteínas, que contém um componente proteico importante: as apolipoproteínas. Os lipídeos obtidos na dieta circulam sobre a forma de quilomícrons (QM) e aqueles sintetizados pelo fígado, sob a forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low density lipoproteins* - VLDL), sendo considerados partículas ricas em triglicerídeos. Sob a ação da lipase lipoproteica no endotélio vascular, tais lipoproteínas liberam triglicerídeos para os tecidos e são transformadas, respectivamente, em remanescentes de QM e lipoproteínas de densidade intermediária (*intermediate density lipoproteins* - IDL). Essas partículas remanescentes são internalizadas pelo fígado por meio da ligação ao receptor de LDL mediada pela apolipoproteína E (apoE). Os QM e as VLVD podem transferir parte de seu conteúdo de triglicerídeos para lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoproteins* - HDL), em troca de ésteres de colesterol, sob ação da enzima CETP (*cholesteryl ester transfer protein*). Na microvasculatura hepática, o excesso de VLDL e IDL pode ser transformado em lipoproteínas de densidade baixa (*low density lipoproteins* - LDL), que se ligam ao receptor celular de LDL, iniciando o processo de depuração e degradação desta partícula (Balarini et al., 2012).

Os principais determinantes da variação da suscetibilidade interindividual ao desenvolvimento da aterosclerose envolvem polimorfismos genéticos nos genes que codificam as apolipoproteínas, uma vez que tais moléculas desempenham papéis cruciais na modulação da concentração plasmática de lipoproteínas e de seu metabolismo (Davignon et al., 1988).

A apoE é um glicoproteína sintetizada pelo fígado, cérebro, rins e outros tecidos e é o principal ligante de dois tipos de receptores: o receptor de LDL (também chamado de receptor B/E) e o receptor específico para apoE, ambos no

fígado (Greenow et al., 2005; Jawień et al., 2004). Além de mediar a depuração de partículas de VLDL e IDL do sangue por meio da ligação a receptores hepáticos de LDL, a apoE está envolvida em outras funções, como o efluxo de colesterol de macrófagos, prevenção de agregação plaquetária, inibição da proliferação de linfócitos T, células endoteliais e musculares lisas e modulação da inflamação e respostas imunes (Balarini et al., 2012; Greenow et al., 2005; Zhang et al., 2011).

O gene que codifica a apoE localiza-se no cromossomo 19 e expressa-se em 3 diferentes isoformas (E2, E3 e E4), além de mais de 20 variantes raras. Tais isoformas variam entre si pela substituição de dois aminoácidos, o que se reflete em profundos efeitos estruturais e funcionais, como sua afinidade de ligação ao receptor de LDL (Davignon et al., 1988).

Durante as duas últimas décadas, o camundongo se tornou um modelo experimental importante em estudos de fisiologia e de um número crescente de condições patofisiológicas, devido ao seu fácil manuseio e reprodução e à disponibilidade de linhagens isogênicas (Vasquez et al., 2012). Considerando o importante papel desempenhado pela apolipoproteína E no metabolismo lipídico e formação do ateroma, no ano de 1992 dois diferentes grupos de pesquisa desenvolveram um modelo experimental de camundongo geneticamente modificado (camundongo apoE *knockout* - apoE^{-/-}), no qual o gene que codifica a apoE foi inativado em células tronco embrionárias por meio de recombinação homóloga (Balarini et al., 2012; Piedrahita et al., 1992; Plump et al., 1992). Uma vez que a apoE atua como o ligante que medeia a captação de partículas de lipoproteínas via receptor de LDL, sua ausência compromete este processo e favorece o acúmulo de tais partículas no plasma, levando à hipercolesterolemia espontânea nestes animais (Kolovou et al., 2008).

É importante salientar, contudo, que o perfil lipídico de camundongos é diferente de humanos, os quais transportam a maior parte do colesterol plasmático em partículas de LDL. Normalmente, camundongos não expressão a enzima CETP, de maneira que o transporte do colesterol plasmático é feito sobretudo em partículas de HDL. Contudo, o perfil lipídico plasmático dos animais apoE^{-/-} se assemelha ao observado em humanos, visto que apresentam um deslocamento das lipoproteínas plasmáticas de HDL para VLDL, IDL e LDL (Jawień et al., 2004; Li et al., 2011) (figura 5).

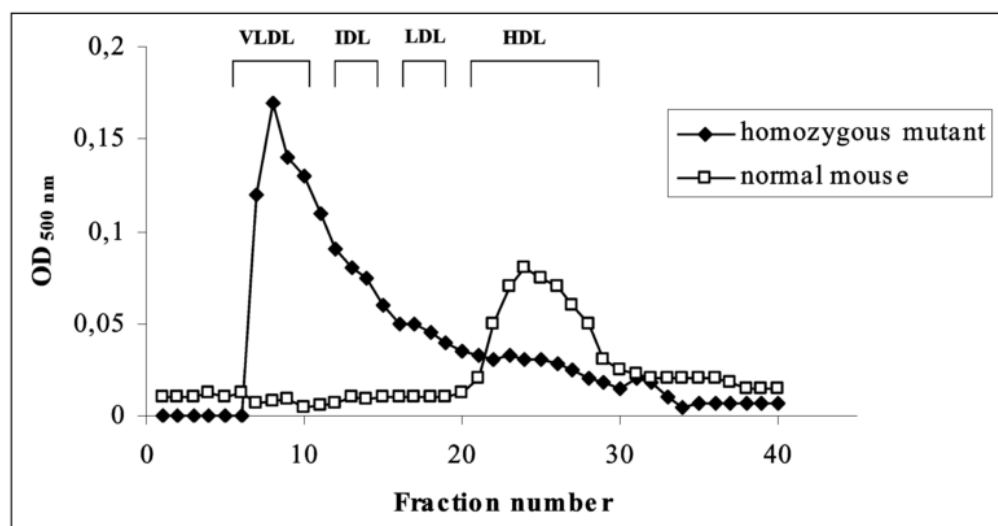


Figura 5: perfil lipídico plasmático em camundongos normais (quadrados brancos) e camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ (losangos pretos). Jawień et al., 2004.

O perfil lipoproteico plasmático de camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ está sujeito a variações decorrentes da dieta. Sob dieta padrão para roedores, os animais $\text{apoE}^{-/-}$ exibem um incremento de aproximadamente 8 vezes no colesterol total, 18 vezes nas frações VLDL + IDL, 14 vezes no LDL e 2 vezes nos triglicerídeos, quando comparados aos animais da linhagem C57BL/6 (animais isogênicos selvagens, isto é, não modificados geneticamente, cuja linhagem serviu de *background* para o desenvolvimento de animais $\text{apoE}^{-/-}$, sendo considerados seus controles). Quando alimentados com dietas hiperlipídicas (também conhecidas por dieta *Western-type*, por mimetizar a dieta ocidental rica em gordura), observa-se um aumento marcante na proporção destas lipoproteínas, com colesterol total atingindo 14 vezes o valor observado nos animais controle, sobretudo na forma de partículas de VLDL e IDL (Vasquez et al., 2012).

A análise do processo aterogênico em camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ revela que a sequencia de eventos envolvida na formação da lesão neste modelo é similar à observada em modelos de maior porte e humanos (Nakashima et al., 1994). Nestes animais, a deposição de placa é observada ao longo de toda a macrovasculatura, sendo a raiz da aorta, o arco aórtico, a artéria mesentérica superior e as artérias renais e pulmonar os principais locais (Vasquez et al., 2012).

Durante bastante tempo, acreditou-se que em modelos murinos de aterosclerose não ocorria a ruptura de placa, o que é bastante comum em humanos e, de fato, é o evento mais preocupante envolvendo a aterosclerose. Entretanto, foi

demonstrado que em animais apoE^{-/-} idosos, as placas localizadas no tronco braquiocefálico demonstram consistir no paralelo murino das placas vulneráveis humanas, incluindo a presença de um núcleo necrótico acelular, erosão da massa necrótica através do lúmen e hemorragia intra-placa (Meir & Leitersdorf, 2004).

Em conjunto, essas observações demonstram que o camundongo apoE^{-/-} consiste em um excelente modelo experimental para o estudo da aterogênese, da relação entre fatores genéticos e ambientais determinantes da aterosclerose e de potenciais intervenções farmacológicas ou não-farmacológicas para redução da deposição de placa (Balarini et al., 2012; Meir & Leitersdorf, 2004).

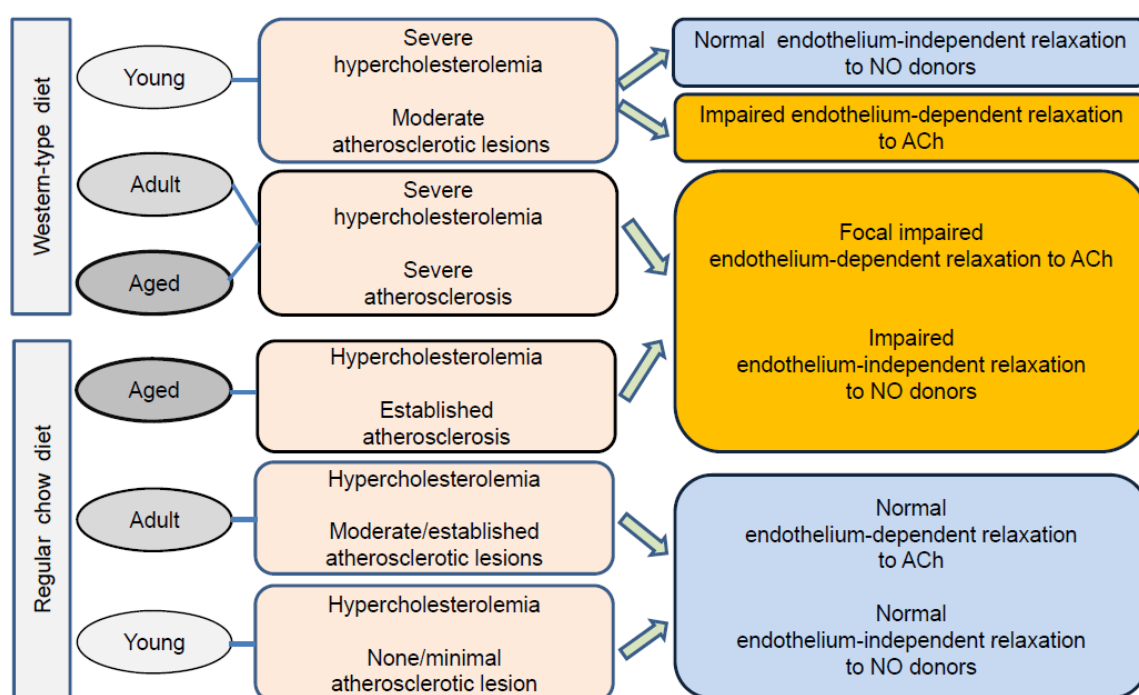


Figura 6: diagrama que demonstra a relação entre dieta, hipercolesterolemia e disfunção endotelial em camundongos apoE^{-/-} em diferentes idades. (Meyrelles et al., 2011)

Conforme demonstrado pela figura 6, que esquematiza a relação entre a dieta e o relaxamento vascular dependente do endotélio em animais apoE^{-/-} em diferentes idades, o conceito de que a disfunção vascular é um dos eventos preliminares e mais marcantes da aterogênese não é completamente embasado por estudos experimentais em modelos murinos de hipercolesterolemia e aterosclerose espontânea (Meyrelles et al., 2011). Na verdade, estudos demonstram que anéis de aorta isolados de animais jovens (entre 6 e 18 semanas de idade) alimentados com dieta padrão exibem resposta vasodilatadora à ACh normal, quando comparados aos controles (Fransen et al., 2008; Villeneuve et al., 2003). Por outro lado, quando

tratados com dieta hiperlipídica, a disfunção endotelial neste modelo é marcante (Custodis et al., 2008; Johansson et al., 2005; Wassmann et al., 2004; Wassmann et al., 2006), de modo que se tornaram modelos ideais para estudos de disfunção endotelial associada à hipercolesterolemia e aterosclerose, semelhante àquela observada em humanos.

Portanto, mediante o exposto e visto que há carência de dados na literatura, este estudo pretendeu investigar o seguinte problema: qual o efeito do tratamento com sildenafil na função vascular de camundongos hipercolesterolêmicos? Nossa hipótese foi de que o tratamento com inibidor da PDE5 seria capaz de promover a melhora da função vascular e redução da placa aterosclerótica no modelo murino *knockout* para apolipoproteína E tratado com dieta hipercolesterolêmica.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que a incidência de doenças cardiovasculares tornou-se uma questão de saúde pública alarmante, estratégias tem sido buscadas para tratar e minimizar os riscos de morbidade e mortalidade associados a estes eventos. Desta forma, a base racional para este trabalho é a hipótese que o tratamento com sildenafil, ao inibir seletivamente a PDE5 e aumentar a disponibilidade de cGMP, seria capaz de promover efeitos vasculares benéficos na hipercolesterolemia e aterosclerose.

Devido ao fato de os mecanismos fisiopatológicos presentes na disfunção endotelial e aterogênese envolvem a redução de biodisponibilidade de NO e o incremento do estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios, associado às evidências de que a inibição farmacológica da PDE5 é capaz de melhorar todos estes parâmetros, pode-se considerar o tratamento com sildenafil como uma estratégia extremamente promissora no combate às doenças cardiovasculares associadas à hiperlipidemia.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento com sildenafil sobre a função vascular de camundongos apoE^{-/-}.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar, em camundongos apoE^{-/-}, os efeitos do tratamento crônico com sildenafil sobre os seguintes parâmetros:

- Perfil lipídico plasmático,
- Reatividade vascular (aorta):
 - resposta vasodilatadora dependente do endotélio *in vitro*,
 - resposta vasodilatadora independente do endotélio *in vitro*,
- Papel do NO e do estresse oxidativo na função vascular *in vitro*,
- Deposição de placa aterosclerótica,
- Produção de ROS e NO *in situ*.
- Integridade do endotélio.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Durante o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) isogênicos, machos, das linhagens C57BL/6 (controles, CT) e animais *knockout* para apolipoproteína E (apoE^{-/-}), com 8 semanas de idade.

Os animais foram mantidos no biotério de pesquisa do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram acondicionados em estantes com circulação de ar (Alesco, São Paulo, Brasil), em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas, sob temperatura controlada (22±1°C) e tiveram acesso à água e alimentação *ad libitum*.

A criação, o manuseio e todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Guia para Manutenção e Uso de Animais de Laboratório do *National Institute of Health* (NIH) e com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO). Os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Superior da Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM, protocolo número 07/2010).

4.2 Grupos Experimentais

Ao atingirem 8 semanas de idade, os animais apoE^{-/-} receberam dieta aterogênica *Western Type* (Rhostrer, São Paulo, Brasil), contendo 41% de calorias em forma de lipídios e 1,5% de colesterol. Esta dieta foi administrada para acelerar o processo de desenvolvimento de disfunção endotelial e placa de aterosclerose, durante as 10 semanas subseqüentes.

Visando avaliar os efeitos da inibição crônica da enzima PDE5 sobre a função vascular e a deposição de placa aterosclerótica, os animais apoE^{-/-} foram divididos em 2 subgrupos: o grupo tratado (apoE^{-/-} sildenafil) recebeu citrato de sildenafil, obtido por meio da trituração de comprimidos de Viagra® (Pfizer, São Paulo, Brasil), na dose de 40mg/kg/dia por via oral (gavagem), durante as 3 últimas semanas de dieta aterogênica. O volume de sildenafil administrado foi ajustado diariamente, de acordo com o peso dos animais. O grupo veículo (apoE^{-/-} veículo) recebeu veículo, em volume aproximadamente igual ao utilizado para tratamento do grupo sildenafil.

Os animais CT foram submetidos ao mesmo protocolo que os camundongos apoE^{-/-} que receberam veículo, exceto pela manipulação da dieta. O protocolo experimental pode ser visualizado no esquema a seguir.

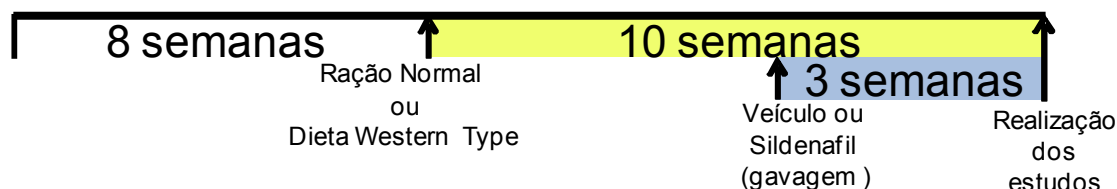


Figura 7: representação esquemática do protocolo de tratamento utilizado.

4.3 Análises Bioquímicas

Amostras de plasma obtidas após a eutanásia (tiopental 200mg/Kg, i.p.) foram utilizadas para a dosagem de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos, utilizando *kits* comerciais colorimétricos (Bioclin®, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil), de acordo com as orientações do fabricante. As leituras foram executadas em espectrofotômetro manual (Biospectro, SP220 Biospectro, Curitiba, Brasil). As concentrações de VLDL e IDL foram estimadas pela subtração das frações de HDL e LDL do valor de colesterol total plasmático.

4.4 Estudos de Função Vascular

Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados e tiveram o sangue recolhido para análises bioquímicas. Os animais foram, em seguida, submetidos a toracotomia para a exposição do coração e aorta, os quais foram cuidadosamente dissecados do tecido conjuntivo e retirados do animal. As peças foram colocadas em placa de Petri, contendo solução de Krebs modificada (concentrações, em mM: NaCl 115; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; EDTA 0,1; glicose 11,1), pH 7,4.

A aorta torácica foi limpa do tecido conjuntivo e cortada em 3 ou 4 anéis de aproximadamente 3 milímetros cada. Em seguida, conforme esquematizado na figura 8, os anéis foram acoplados, por meio do lúmen vascular, a triângulos de aço inoxidável de forma a permanecerem paralelos. Então, foram acondicionados em cuba de vidro de 5 mL de volume, contendo a mesma solução nutritiva de Krebs, constantemente aerada por mistura carbogênica contendo 95% O₂ e 5% CO₂ e mantida sob temperatura de 37°C com o auxílio de um banho-maria com circulação

de água. Um dos triângulos foi fixado à parede da cuba e o outro acoplado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica, conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100, Biopac Systems, Califórnia, EUA). Desta maneira, alterações no diâmetro vascular frente à adição de drogas vasoativas eram captadas enviadas a um computador.

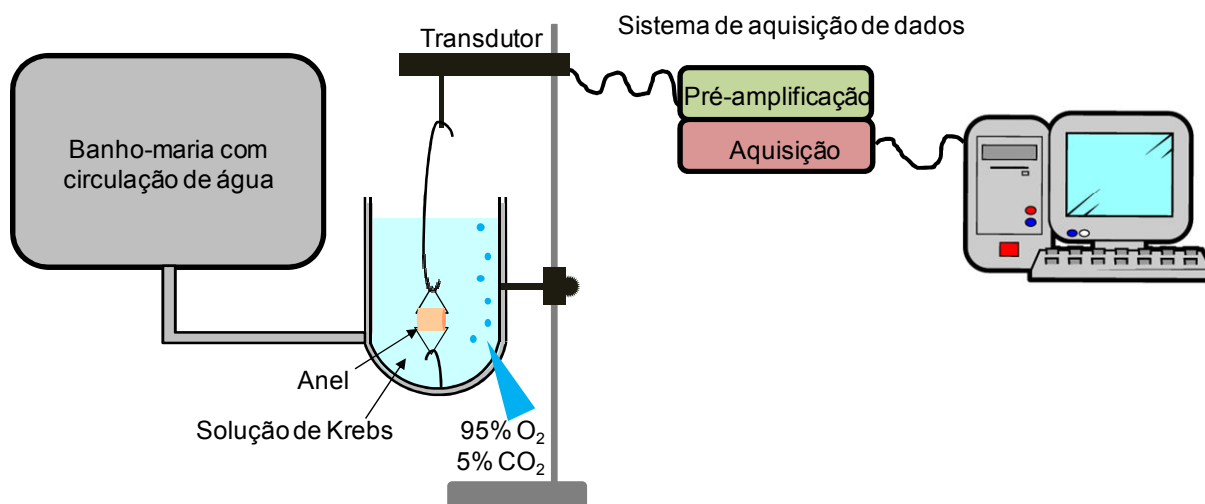


Figura 8: esquematização do sistema para estudo de reatividade de anéis de aorta.

4.4.1 Avaliação da Viabilidade dos Anéis e Teste do Endotélio

Em seguida à montagem do sistema, os anéis foram gradativamente submetidos a uma tensão basal de 0,5 gramas, reajustada quando necessário. Seguido o período de estabilização de 60 minutos, a viabilidade dos anéis foi avaliada após administração de 125 mM de KCl (figura 9 A), o qual devia gerar uma contração por despolarização de, pelo menos, o dobro do valor basal de tensão (figura 9 B). Em seguida, após a troca da solução nutritora e estabilização de 30 minutos (figura 9 C), a contração máxima de cada peça foi avaliada após adição com 125 mM de KCl por 30 minutos (figura 9 D-F).

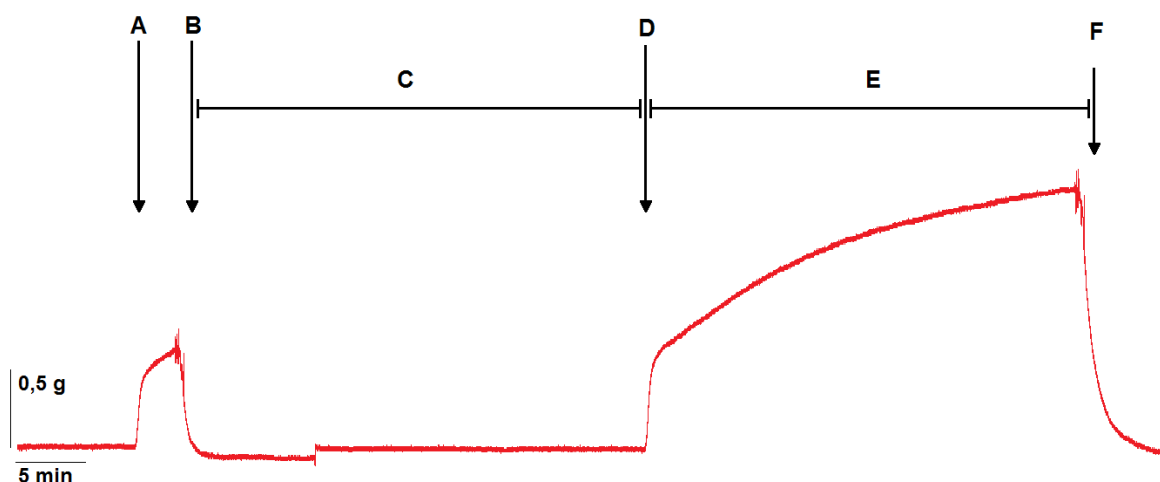


Figura 9: representação esquemática da avaliação da viabilidade dos anéis, construída a partir de um registro típico experimental. A: administração de 125 mM de KCl, B: troca da solução nutritiva quando o valor de tensão atingiu o dobro do valor basal (aproximadamente 1 grama), C: estabilização de 30 minutos, D: administração de 125 mM de KCl, E: período de 30 minutos, até a contração máxima (aproximadamente 2 gramas), F: troca da solução nutritiva.

Assegurada a viabilidade dos anéis, teve seguimento o teste da integridade do endotélio vascular (figura 10). A cada anel, adicionou-se 10 μ M do agonista alfa adrenérgico fenilefrina (*phenylephrine* – Phe). Em seguida, o relaxamento vascular dependente do endotélio foi induzido a partir da adição do agonista de receptores muscarínicos acetilcolina (*acetylcholine* – ACh). O endotélio foi considerado íntegro quando registrou-se um relaxamento igual ou superior a 50% da contração induzida pela Phe. Os anéis que apresentaram relaxamento inferior a 50% foram descartados.

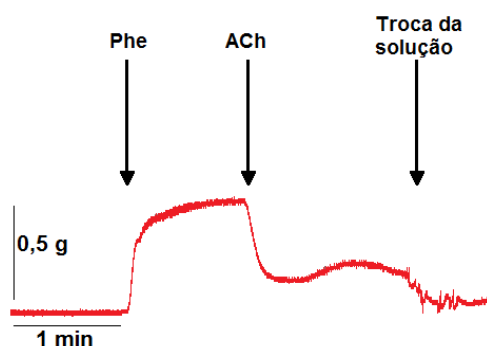


Figura 10: representação esquemática da avaliação da integridade do endotélio, construída a partir de um registro típico experimental. Phe: administração de 10 μ M de Phe, ACh: administração de 10 μ M de ACh.

4.4.2 Protocolos de Reatividade Vascular

Os protocolos de reatividade vascular foram executados por meio da construção de curvas dose-resposta a substâncias vasoativas. Neste caso, após a estabilização de 30 minutos, os vasos eram submetidos a doses crescentes de substâncias vasoativas, permitindo o registro da variação de tensão em função do tempo (figura 11).

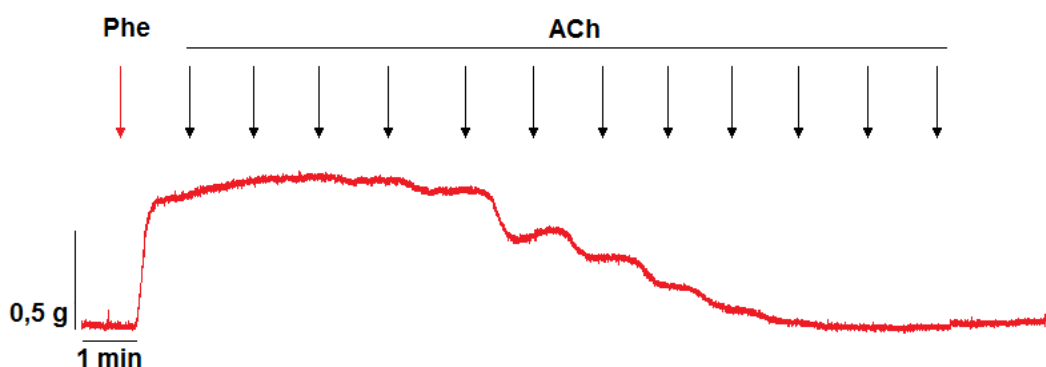


Figura 11: representação esquemática de uma curva dose-resposta à substância vasodilatadora, construída a partir de um registro típico experimental. A seta vermelha indica pré-contrução (10 μ M de Phe) e as setas pretas indicam a administração de doses crescente de substância vasoativa (no caso, ACh em concentrações entre 10^{-10} e 3×10^{-5} M).

A escolha das drogas utilizadas foi delineada com o objetivo de responder as principais perguntas no que tange ao comprometimento da função endotelial em animais hipercolesterolêmicos e a esperada melhora da função promovida pelo tratamento com sildenafil.

Neste caso, a avaliação da função endotelial foi realizada por meio da construção de curva de relaxamento dos anéis frente à administração de doses crescentes de ACh (10^{-10} a 3×10^{-5} M), realizada após pré contração com Phe (10 μ M, figura 11).

A avaliação da participação do óxido nítrico no relaxamento vascular dependente do endotélio foi realizada por meio da construção de uma curva de relaxamento à ACh após 20 minutos de bloqueio prévio da síntese de óxido nítrico pelo inibidor padrão não seletivo da NOS N-G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 100 μ M).

Para avaliar o papel do estresse oxidativo no relaxamento vascular dependente de endotélio, após a utilização de apocinina, um inibidor da enzima

NADPH-oxidase e antioxidante (300 μ M, 20 minutos), foi construída uma curva de relaxamento frente à ACh.

A sensibilidade do músculo liso ao óxido nítrico foi avaliada por meio da construção de uma curva de relaxamento frente a concentrações crescentes do doador de NO, nitroprussiato de sódio (NPS, 10^{-10} a 3×10^{-5} M), após pré-contracção com Phe (10 μ M).

Após contracção à Phe, os anéis foram incubados com o inibidor não específico da isoformas da óxido nítrico sintase L-NAME (100 μ M) durante 20 minutos. A ativação basal da cascata NO/cGMP foi inferida pelo incremento percentual da contracção, após a adição de L-NAME.

4.5 Histologia Vascular

A avaliação da deposição de placa aterosclerótica foi feita em grupos de animais diferentes daqueles utilizados para estudos de função vascular. Neste caso, após eutanásia, os animais foram perfundidos com salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline* – PBS), pH 7,4. Em seguida, foi realizada fixação dos tecidos com paraformaldeído a 4% em PBS pH 7,4. As aortas foram cuidadosamente retiradas, limpas e armazenadas em fixador até o momento do processamento histológico. Para a realização dos cortes histológicos (7 μ m de espessura), as peças montadas em OCT (Sakura Finetek, Califórnia, EUA) foram congeladas e cortadas em micrótomo criostato (CM1850, Leica, Nussloch, Alemanha). Os corte obtidos a partir da raiz da aorta, com foram montados em lâminas gelatinizadas e armazenados em geladeira até o momento da coloração por, no máximo, 1 semana.

4.5.1 Coloração com OilRed

A quantificação da deposição de placa aterosclerótica foi feita em corte corados com o corante de lipídios neutros *Oil-Red-O* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após retirada do OCT com água, as lâminas foram mantidas em contato com o corante com o lado onde estavam os cortes voltados para baixo, para evitar precipitação, por 10 minutos. O excesso de corante foi lavado com água corrente e os cortes foram cobertos por PBS e lamínula. A lesão aterosclerótica foi quantificada em fotomicrografias capturadas utilizando-se um microscópio (Olympus AX70, Olympus, Center Valley, PA, EUA), interfaceado a uma câmera digital (VKC150,

Hitachi, Tokyo, Japão) e a análise das imagens foi feita com o sistema de análise *Image J* (domínio público).

A área de deposição de placa aterosclerótica em cada animal foi quantificada por um investigador cego ao grupo experimental e foi expressa como porcentagem do lúmen vascular ocupada pela placa aterosclerótica.

4.5.2 Marcação com DHE

Para a avaliação do estresse oxidativo tecidual *in situ*, cortes de tecido não fixados foram mantidos a 37°C e incubados durante 30 minutos em câmara úmida, com o corante fluorescente dihidroetidina (DHE, 2 µM) em solução de Krebs contendo HEPES (20 mmol). O corante, na presença de $\cdot\text{O}_2^-$ e outras ROS, é oxidado a etídeo, interage com o DNA da célula e emite fluorescência vermelha (Sharikabad et al., 2013).

A intensidade de fluorescência foi considerada proporcional ao estresse oxidativo tecidual e foi quantificada em fotomicrografias capturadas utilizando-se um microscópio acoplado a câmera digital (Nikon Eclipse TI, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA), por um observador cego aos protocolos experimentais, utilizando o programa *Image J*.

4.5.3 Marcação com DAF

Para a avaliação da produção de óxido nítrico tecidual *in situ*, cortes de tecido não fixados foram mantidos a 37°C e incubados durante 30 minutos em câmara úmida, com o corante fluorescente diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA, 2 µM) em solução de Krebs contendo HEPES (20 mmol). O corante é capaz de penetrar no citoplasma celular, onde é clivado em 4,5-diaminofluoresceína. Na presença de NO, este composto forma o produto triazólico triazolofluoresceína (DAF-2T), que emite fluorescência de cor verde, cuja intensidade é proporcional à concentração intracelular de NO (Schachnik, 2008). A intensidade de fluorescência foi quantificada em fotomicrografias capturadas utilizando-se um microscópio de fluorescência, acoplado à câmera digital (Nikon Eclipse TI, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA), por um observador cego aos protocolos experimentais, utilizando o programa *Image J*.

4.5.4 Microscopia Eletrônica

A realização de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi executada em fragmentos de aorta cortados longitudinalmente para permitir a visualização do lúmen vascular, lavados brevemente com a mesma solução de Krebs utilizada nos experimentos de reatividade vascular e fixadas com glutaraldeído 2,5%. Em seguida, as peças foram pós-fixadas com uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 3,8% de ferrocianeto de potássio e 2.5mM de CaCl_2 . Por fim, foram desidratadas em acetona e secas no ponto crítico, cobertas com uma camada de 20 nm de ouro e observadas em microscópio (Zeiss 940 DSM, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemanha) (Dos Santos et al., 2012).

4.6 Análise Estatística

As respostas vasodilatadoras à ACh e ao NPS foram expressas como a porcentagem de dilatação em relação ao nível máximo de pré-contracção. Para cada curva dose-resposta, a resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e o log da dose de agonista que produziu metade da $R_{\text{máx}}$ ($\log \text{EC}_{50}$) foram calculados por regressão não linear (Prism 5, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A sensibilidade ao agonista foi expressa como pEC_{50} ($-\log \text{EC}_{50}$). Nas curvas em que foi feito bloqueio farmacológico, alguns resultados estão expressos como a diferença entre as áreas abaixo da curva na presença e ausência do fármaco inibidor (dAUC), representando a modulação do fator bloqueado sobre a resposta observada.

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística das curvas entre os grupos, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de 2 vias para medidas repetidas, seguida pelo *post hoc* de Tukey. As comparações entre as $R_{\text{máx}}$, pEC_{50} , dados bioquímicos e histológicos entre os grupos foi feita por ANOVA de 1 via, seguida pelo *post hoc* de Tukey. As comparações intragrupo de $R_{\text{máx}}$ e pEC_{50} na presença e ausência de bloqueio foram feitas por teste t. As análises foram realizadas utilizando-se o programa Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Perfil lipídico plasmático e dados ponderais

Os resultados da avaliação bioquímica do perfil lipídico plasmático e dos dados ponderais dos animais estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Perfil lipídico plasmático e dados ponderais dos animais controle (CT), apoE^{-/-} veículo e apoE^{-/-} tratados com sildenafil.

Parâmetro	CT	apoE ^{-/-} veículo	apoE ^{-/-} sildenafil
Peso inicial (g)	25,6±0,8	25,3±0,8	22,8±0,7
Peso final (g)	25,4±1,3	24,3±0,7	22,5±0,5
Triglicerídeos (mg/dL)	61±9	241±36**	196±46*
Colesterol plasmático total (mg/dL)	94±5,2	1308±145**	1310±223**
LDL (mg/dL)	23±6,2	180±29,4**	190±49**
HDL (mg/dL)	58±4,0	15±4,2**	10±0,9**
VLDL e IDL calculado (mg/dL)	26±5,2	1115±28**	1111±48**

Valores representados como média ± EPM de 4-10 animais por grupo.

*p<0,05 e **p<0,01 vs. CT

Não observou-se diferença significativa no peso dos animais antes ou após o período experimental. Conforme esperado, os animais apoE^{-/-} apresentaram perfil lipoproteico plasmático diferente dos animais CT, visto que acumulam colesterol sobretudo sob a forma de partículas de VLDL e IDL, apresentando portanto uma redução de aproximadamente 5 vezes na concentração plasmática de HDL. Considerando que os camundongos apoE^{-/-} receberam dieta aterogênica, apresentaram um incremento de aproximadamente 3 vezes na concentração de triglicerídeos, 14 vezes na concentração de colesterol total, 8 vezes na concentração de LDL e 43 vezes na concentração de VLDL+IDL quando comparados aos respectivos controles normocolesterolêmicos.

Não houve influência do tratamento com sildenafil sobre o perfil lipoproteico plasmático dos animais apoE^{-/-}. Neste grupo, a distribuição e concentração de lipoproteínas plasmáticas é semelhante ao observado nos camundongos apoE^{-/-} que receberam apenas veículo.

5.2 Reatividade vascular

Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados nas curvas dose-resposta (eficácia - $R_{\text{máx}}$ e sensibilidade - pEC_{50}) estão expressos na tabela 2.

Tabela 2. Efeitos do tratamento com sildenafil na eficácia ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pEC_{50}) a agentes vasoativos em anéis de aorta isolados de animais controle (CT), $\text{apoE}^{-/-}$ veículo e $\text{apoE}^{-/-}$ sildenafil.

Parâmetro	CT	$\text{apoE}^{-/-}$ veículo	$\text{apoE}^{-/-}$ sildenafil
Acetilcolina			
$R_{\text{máx}}$ (%)	87±3,6	66±9,7*	95±3,1 [#]
pEC_{50}	7,3±0,1	6,1±0,1**	7,2±0,3 ^{##}
Acetilcolina + apocinina			
$R_{\text{máx}}$ (%)	84±5,2	101±4,6 ^{§§}	94±3,7
pEC_{50}	7,3±0,2	7,3±0,2 ^{§§}	7,2±0,2
Acetilcolina + L-NAME			
$R_{\text{máx}}$ (%)	11±2,0 ^{§§}	18±4,4 ^{§§}	12±2,8 ^{§§}
pEC_{50}	8,7±0,5 [§]	8,5±0,2 ^{§§}	7,3±1,1
Nitroprussiato de sódio			
$R_{\text{máx}}$ (%)	98±1,3	106±2,1	103±3,5
pEC_{50}	7,3±0,1	7,1±0,2	7,1±0,2

$R_{\text{máx}}$: resposta máxima (eficácia). pEC_{50} : logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade).

Valores expressos como média ± EPM de 3-10 animais por grupo.

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. CT

[#] $p < 0,05$ e ^{##} $p < 0,01$ vs. $\text{apoE}^{-/-}$ veículo

[§] $p < 0,05$ e ^{§§} $p < 0,01$ vs. respectivo controle sem bloqueio

5.2.1 Relaxamento à acetilcolina

A função endotelial foi avaliada por meio da construção de curvas de relaxamento à acetilcolina (ACh) após pré-contracção com fenilefrina (Phe). Conforme representado na figura 12 A e na tabela 2, os camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ que receberam veículo apresentaram marcante comprometimento da função endotelial quando comparados aos animais controle, conforme demonstrado pelo prejuízo no relaxamento vascular frente à acetilcolina (redução de $R_{\text{máx}}$ e pEC_{50}).

O tratamento crônico com sildenafil durante 3 semanas foi eficiente em reestabelecer a função endotelial nos camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ tratados, conforme demonstrado pela figura 12 B e pelos dados fornecidos na tabela 2.

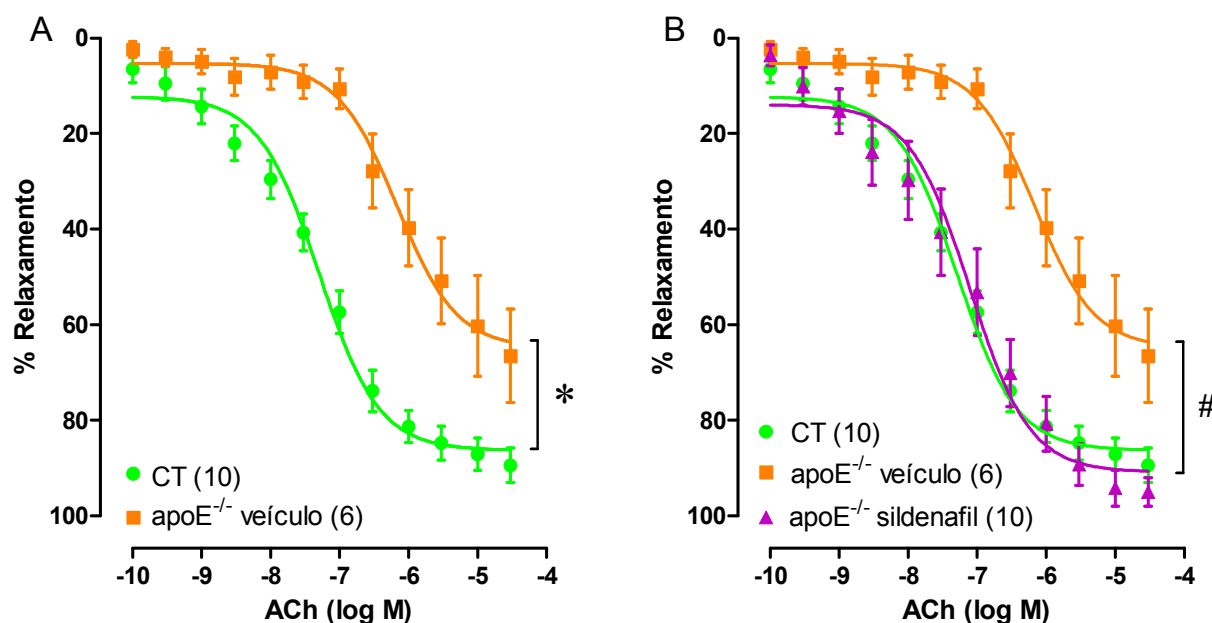


Figura 12: Representação gráfica das curvas dose-resposta à acetilcolina. A: curvas comparativas entre os resultados dos animais controle (CT) e apoE^{-/-} veículo. B: comparação entre os animais apoE^{-/-} tratados com sildenafil e apoE^{-/-} não tratados (veículo). Valores expressos como média ± EPM. *p<0,05 CT vs. apoE^{-/-} veículo e #p<0,05 apoE^{-/-} veículo vs. apoE^{-/-} sildenafil.

5.2.2 Papel do óxido nítrico no relaxamento vascular à acetilcolina

O papel do óxido nítrico no relaxamento vascular dependente do endotélio (resposta à ACh) foi avaliado por meio da construção de curvas-dose resposta à acetilcolina, após bloqueio prévio com L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS. O NO pode ser considerando o principal vasodilatador em anéis de aorta, visto que o bloqueio com L-NAME abole praticamente toda a resposta vasodilatadora em ambos os grupos (figura 13, tabela 2). Entretanto, a magnitude da influência do NO na resposta à ACh foi diferente, conforme demonstrado pela diferença na área abaixo das curvas com e sem bloqueio, em cada um dos grupos estudados (figura 13 D).

O papel do NO na vasodilatação induzida por acetilcolina encontrou-se reduzido em animais apoE^{-/-} que receberam veículo quando comparados aos camundongos controle, como pode ser visto na figura 12 D, pela redução da diferença da área abaixo da curva nestes animais (58,3±16,8** vs. 230±10,6).

O tratamento com sildenafil foi eficiente em reestabelecer a participação do NO na resposta vasodilatadora à ACh em anéis de aorta de animais tratados (58,3±16,8 vs. 233±10,2##).

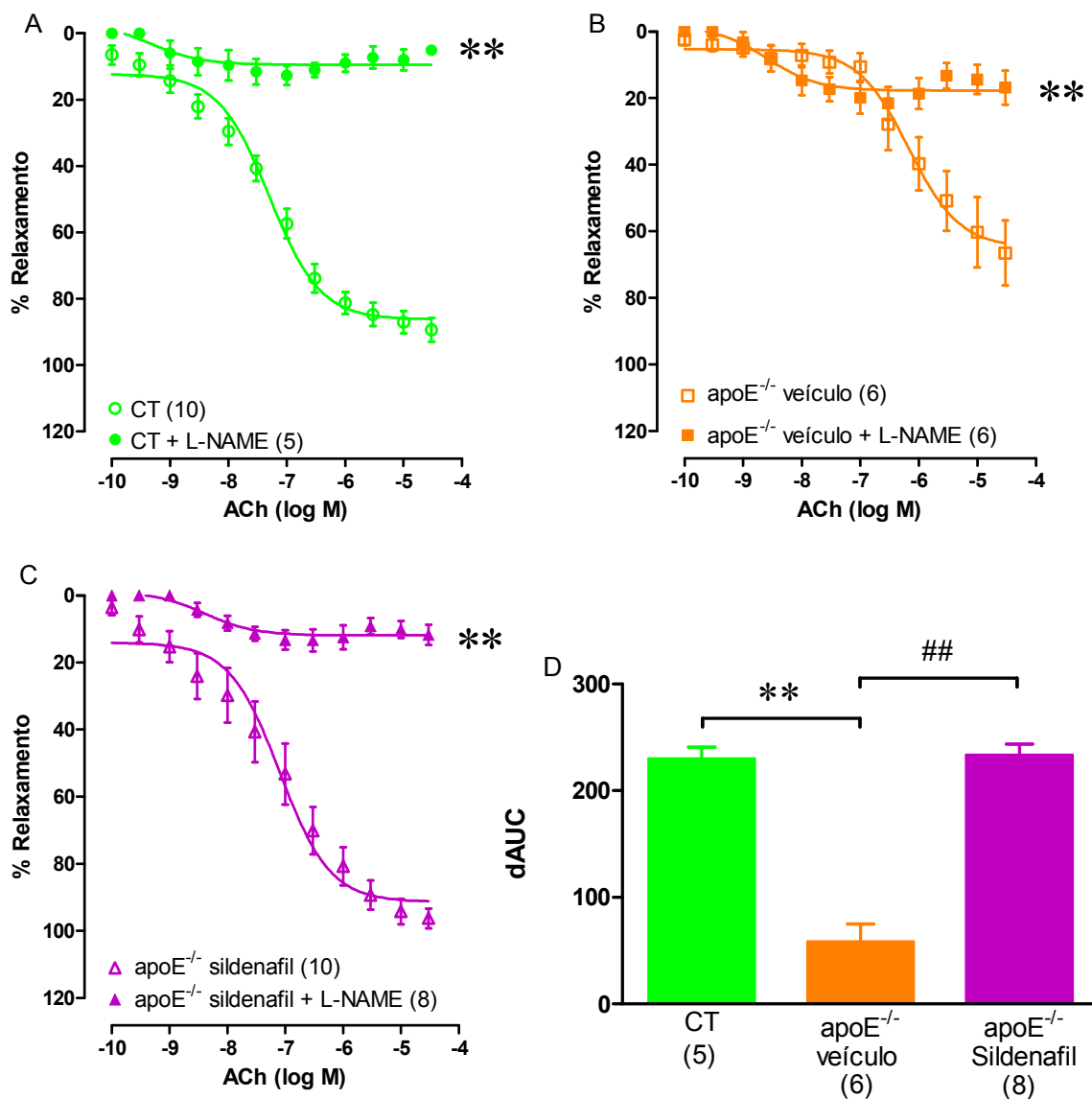


Figura 13: Representação gráfica das curvas dose-resposta à acetilcolina após inibição com L-NAME. A: curvas comparativas entre os animais controle (CT) na presença e ausência de L-NAME. B: curvas comparativas entre os camundongos apoE^{-/-} veículo na presença e ausência de L-NAME. C: curvas comparativas entre os animais apoE^{-/-} sildenafil na presença e ausência de L-NAME. Valores expressos como média \pm EPM. **p<0,01 vs. respectivo controle sem bloqueio. D: representação gráfica da diferença entre as áreas abaixo da curva (dAUC) na presença e ausência de L-NAME, em cada um dos grupos experimentais. **p<0,01 CT vs. apoE^{-/-} veículo e ##p<0,01 apoE^{-/-} veículo vs. apoE^{-/-} sildenafil.

5.2.3 Papel do estresse oxidativo no relaxamento vascular à acetilcolina

Para a avaliação da influência do estresse oxidativo no relaxamento vascular à ACh, os anéis foram previamente incubados com o antioxidante apocinina, seguindo-se da construção de curvas dose-resposta frente à administração de doses crescentes de acetilcolina.

Conforme demonstrado pela figura 14 B e pela tabela 2, apenas os animais apoE^{-/-} que receberam veículo apresentam participação significativa do estresse oxidativo na resposta à ACh, demonstrada pelo deslocamento significativo da curva na presença de apocinina em relação à curva sem bloqueio. Desta maneira, infere-se que o tratamento com sildenafil foi eficiente em reduzir o estresse oxidativo nestes animais, visto que o papel das espécies reativas de oxigênio na vasodilatação dos animais tratados é desprezível (figura 14 C e tabela 2).

Ainda, quando foi feita a comparação entre todas as curvas, observou-se que a apocinina foi capaz de reverter a disfunção endotelial em camundongos apoE^{-/-} que receberam apenas veículo, demonstrando que esta via é importante no estabelecimento do prejuízo vascular destes animais.

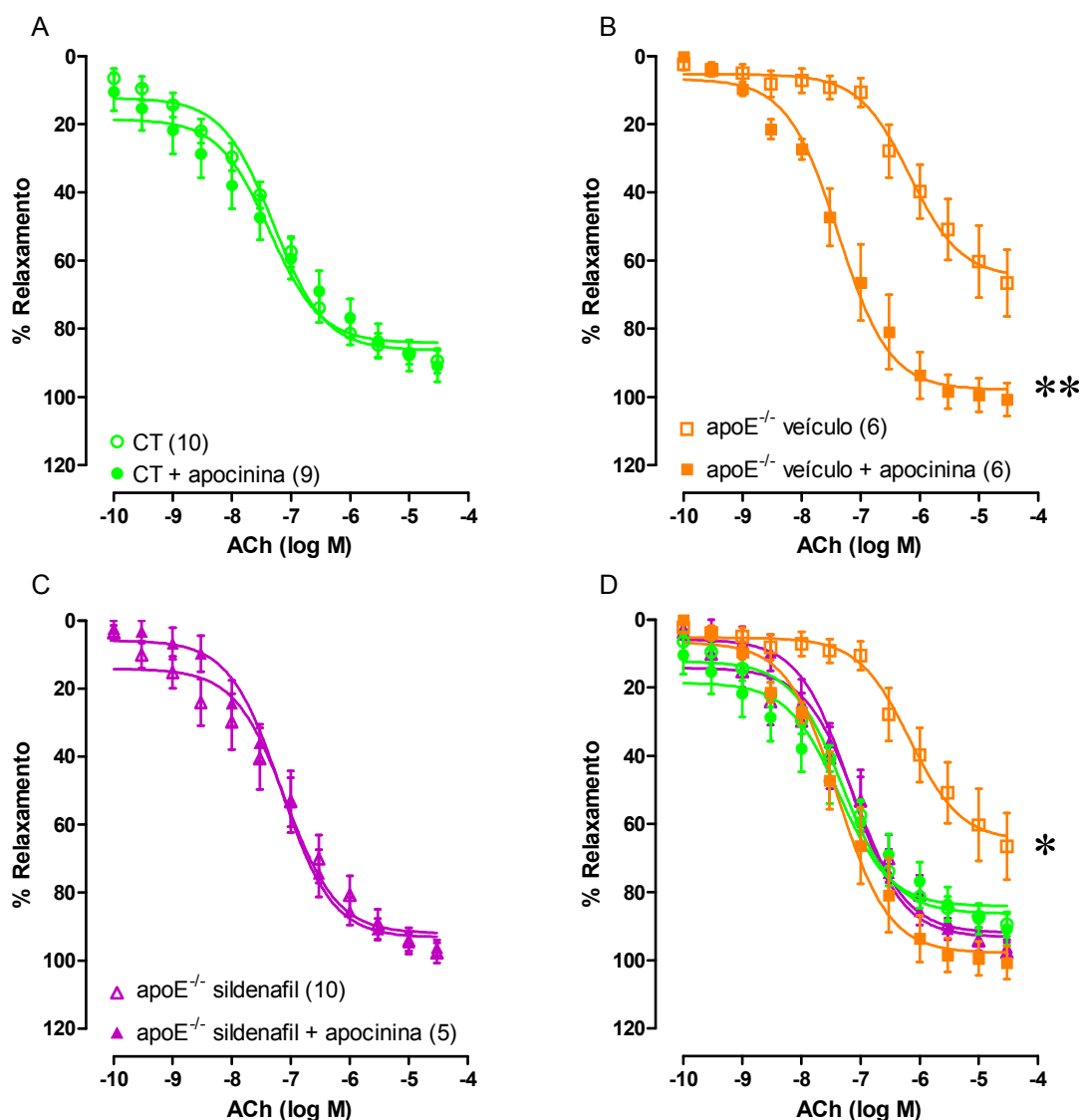


Figura 14: Representação gráfica das curvas dose-resposta à acetilcolina após inibição com apocinina. A: curvas comparativas entre os animais controle (CT) na presença e ausência de apocinina. B: curvas comparativas entre os animais apoE^{-/-} veiculo na presença e ausência de apocinina. C: curvas comparativas entre os animais apoE^{-/-} sildenafil na presença e ausência de apocinina. Valores expressos como média ± EPM. **p<0,01 vs. respectivo controle sem bloqueio. D: agrupamento de todas as curvas, na presença e ausência de apocinina. Valores expressos como média ± EPM. *p<0,05 CT vs. apoE^{-/-} veiculo.

5.2.4 Resposta do músculo liso vascular ao óxido nítrico

Para a avaliação da resposta do músculo liso vascular ao NO, independente da participação do endotélio, foi construída uma curva de relaxamento ao doador de NO nitroprussiato de sódio (NPS) após pré-contracção com Phe. Os estão demonstrados na tabela 2 e na figura 15. Como pode ser observado, não houve diferença na resposta muscular lisa ao NO entre os grupos estudados.

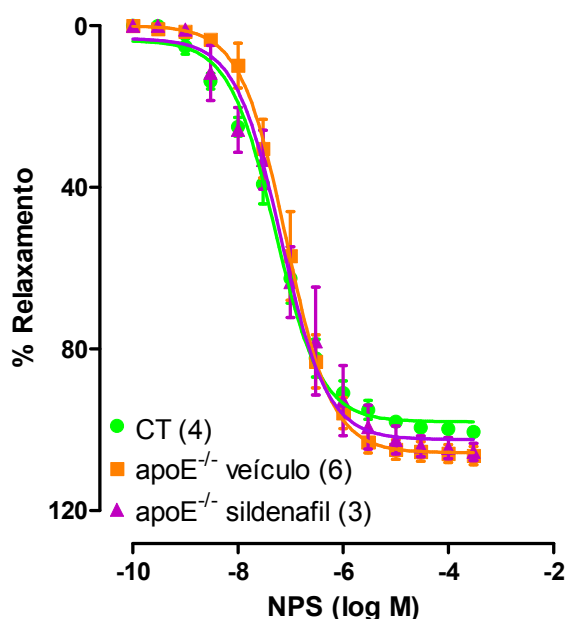


Figura 15: Representação gráfica das curvas dose-resposta ao nitroprussiato de sódio. Valores expressos como média \pm EPM.

5.2.5 Ativação basal da cascata NO/cGMP

A ativação basal da cascata NO/cGMP (isto é, independente do estímulo por acetilcolina) foi avaliada em anéis pré-contráidos com Phe, aos quais foi adicionado o inibidor não específico da NOS, L-NAME. O incremento percentual de contração em relação ao valor observado antes da administração de L-NAME foi considerado como o valor basal de ativação da cascata.

De acordo com o demonstrado na figura 16, os camundongos apoE^{-/-} apresentam redução da ativação basal da cascata, quando comparados aos respectivos controles normocolesterolêmicos ($59,4 \pm 8,6^*$ vs. $96,6 \pm 7,2$), a qual foi completamente restabelecida nos animais tratados com sildenafil ($128,6 \pm 14,7^{##}$ vs. $59,4 \pm 8,6$).

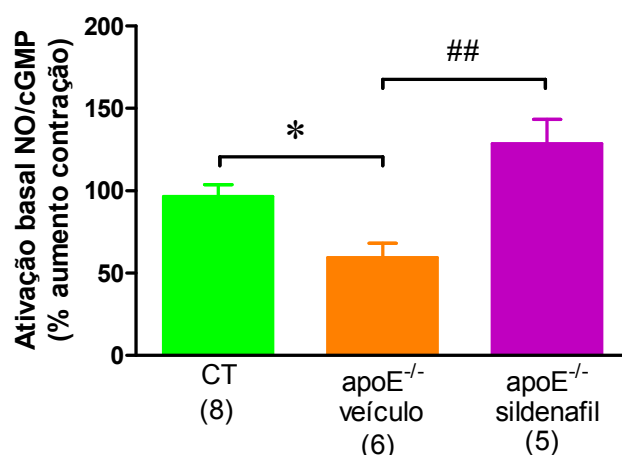


Figura 16: Representação gráfica do incremento da contração à fenilefrina após adição de L-NAME (ativação basal da cascata NO/cGMP). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ CT vs. apoE^{-/-} veículo e ## $p < 0,01$ apoE^{-/-} veículo vs. apoE^{-/-} sildenafil.

5.3 Deposição de placa aterosclerótica

A figura 17 representa graficamente os resultados obtidos para a deposição de placa aterosclerótica na aorta dos animais estudados. Observa-se que os animais apoE^{-/-} que receberam veículo apresentam marcante deposição de placa quando comparados aos animais controle ($37,7 \pm 3,4^{**}$ vs. $0,4 \pm 0,4\%$) e que houve uma redução de aproximadamente 40% na deposição de placa nos animais apoE^{-/-} tratados com sildenafil ($37,7 \pm 3,4$ vs. $21,3 \pm 5,0^{\#}$). As fotomicrografias abaixo de cada barra do gráfico representam imagens típicas de cada um dos grupos.

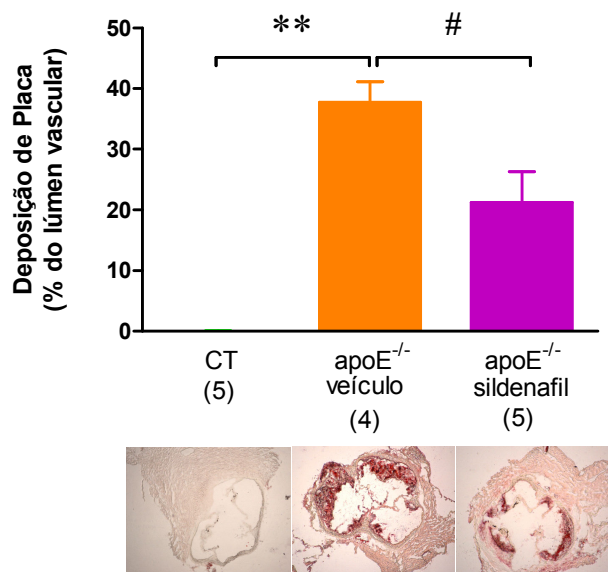


Figura 17: Representação gráfica da deposição de placa aterosclerótica na aorta de animais controle (CT), apoE^{-/-} veículo e apoE^{-/-} sildenafil. As imagens abaixo das barras representam fotos típicas de cortes histológicos de aorta corados com Oil-red de cada um dos respectivos grupos estudados. A barra de escala corresponde a 500µm. **p<0,01 CT vs. apoE^{-/-} veículo e #p<0,05 apoE^{-/-} veículo vs. apoE^{-/-} sildenafil.

5.4 Produção de espécies reativas de oxigênio

A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada *in situ* por meio da marcação de cortes histológicos não fixados com o corante fluorescente dihidroetídeo (DHE). Observou-se que mesmo os animais controle apresentam um nível normal de produção de espécies reativas de oxigênio ($2,25 \pm 0,12$) (figura 18, barra verde). Nos animais apoE^{-/-} veículo, houve um aumento do estresse oxidativo ($3,47 \pm 0,41^*$), o qual foi revertido aos níveis do controle pelo tratamento com sildenafil ($2,42 \pm 0,21^\#$).

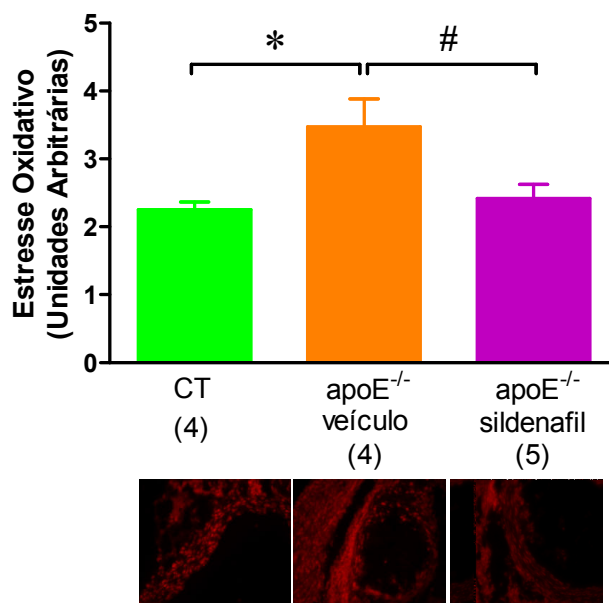


Figura 18: Representação gráfica da marcação com DHE na aorta de animais controle (CT), apoE^{-/-} veículo e apoE^{-/-} sildenafil. As imagens abaixo das barras representam fotos típicas de cortes histológicos de aorta marcados com DHE de cada um dos respectivos grupos estudados. A barra de escala corresponde a 100µm. *p<0,05 CT vs. apoE^{-/-} veículo e #p<0,05 apoE^{-/-} veículo vs. apoE^{-/-} sildenafil.

5.5 Produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi avaliada, *in situ*, pela marcação com 4,5-diaminofluoresceína, que forma um produto triazólico na presença de NO e torna-se fluorescente. Considerou-se que a intensidade de fluorescência produzida foi proporcional ao NO formado.

Conforme demonstrado na figura 19, os camundongos ateroscleróticos que receberam veículo apresentaram redução da produção de NO quando comparados aos controles normocolesterolêmicos ($38 \pm 5,2$ vs. $17,8 \pm 1,2^*$). O tratamento crônico com sildenafil foi capaz de reverter completamente este quando nos animais ateroscleróticos ($17,8 \pm 1,2$ vs. $38,2 \pm 6,8^\#$).

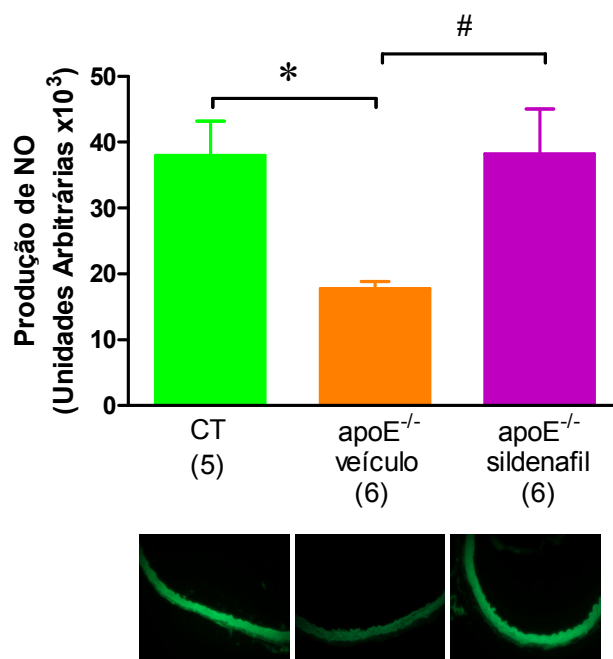


Figura 19: Representação gráfica da marcação com DAF na aorta de animais controle (CT), apoE^{-/-} veículo e apoE^{-/-} sildenafil. As imagens abaixo das barras representam fotos típicas de cortes histológicos de aorta marcados com DAF de cada um dos respectivos grupos estudados. A barra de escala corresponde a 100µm. *p<0,05 CT vs. apoE^{-/-} veículo e #p<0,05 apoE^{-/-} veículo vs. apoE^{-/-} sildenafil.

5.6 Integridade do endotélio

A integridade endotelial foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. A análise das fotomicrografias (figura 20) revelaram a superfície endotelial normal nos camundongos controle, sem adesão de células sanguíneas (A e B). No grupo apoE^{-/-} que recebeu apenas veículo, observou-se irregularidade na superfície endotelial, a qual se apresentou descontínua e acidentada, com perda da estrutura normal e acúmulo de células sanguíneas e fibrina (C e D). O tratamento dos animais apoE^{-/-} com sildenafil reverteu parcialmente a irregularidade da superfície endotelial, embora ainda tenha sido possível observar a adesão de células sanguíneas à superfície endotelial (E e F).

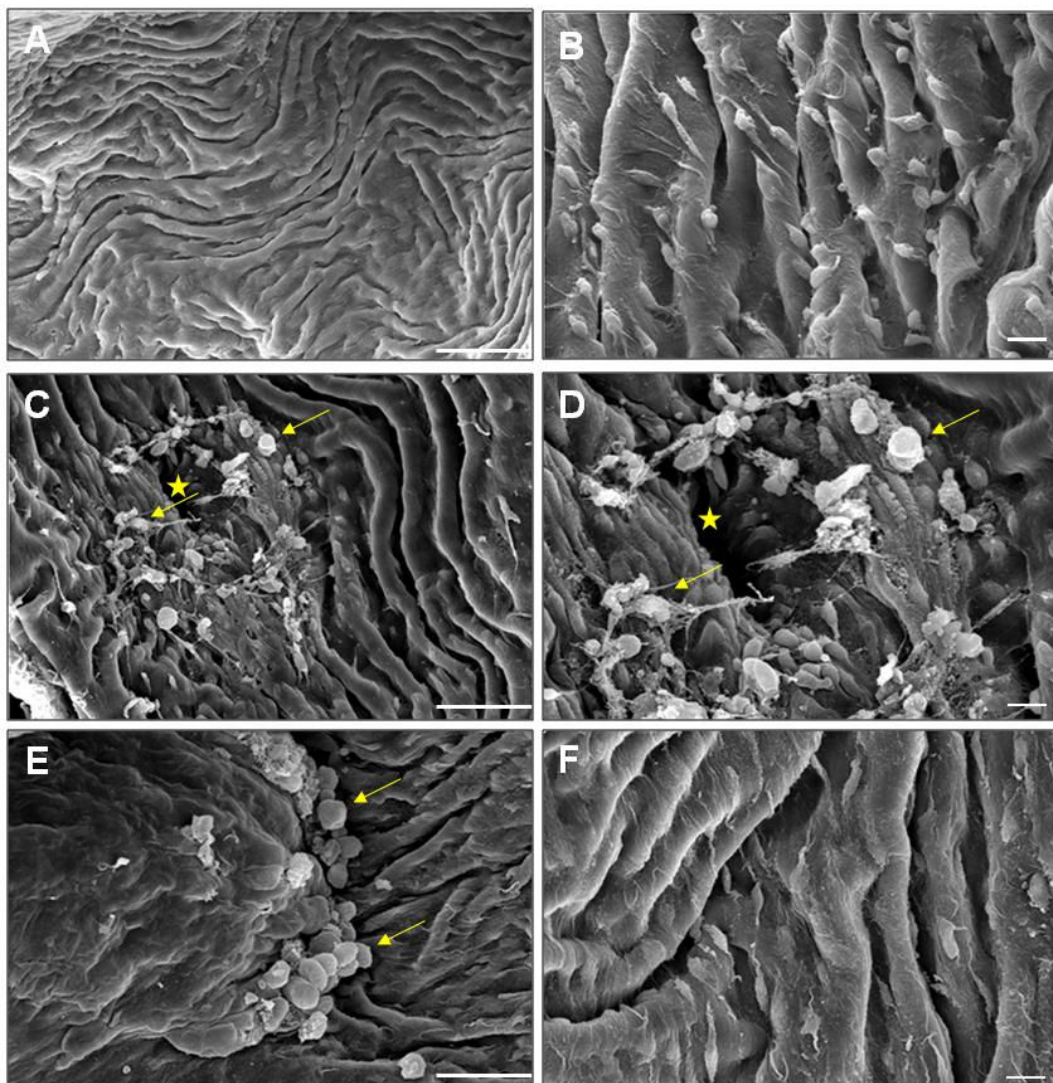


Figura 20: Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura demonstrando a superfície endotelial normal em animais CT (A e B). C e D apresentam a superfície endotelial de animais ateroscleróticos apoE^{-/-} que receberam apenas veículo. É possível observar a irregularidade e descontinuidade do endotélio (estrela) e o acúmulo de células sanguíneas e fibrina sobre a superfície endotelial (setas). O tratamento com sildenafil (E e F) foi capaz de reverter parcialmente a descontinuidade endotelial, embora ainda se observe a adesão de células sanguíneas (setas). A barra de escala em A, C e E corresponde a 50 µm e em B, D e F, a 10µm.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Neste estudo demonstrou-se que a inibição crônica da enzima fosfodiesterase 5, obtida pelo tratamento com sildenafil, ao reduzir o estresse oxidativo e aumentar a ativação da via NO/cGMP, foi capaz de melhorar a função endotelial e reduzir a deposição de placa aterosclerótica em animais experimentais apoE^{-/-}, mesmo na ausência de redução de colesterol ou alteração do perfil lipoproteico plasmático.

O incremento do colesterol total plasmático em aproximadamente 14 vezes é um achado esperado em camundongos apoE^{-/-} submetidos à dieta aterogênica, administrada com o objetivo de acelerar o desenvolvimento da disfunção endotelial e aterosclerose (Meyrelles et al., 2011). Nestes modelo murino, o colesterol circula sobretudo na forma de partículas de VLDL e IDL, ao contrário do que se costuma observar em camundongos (Jawień et al., 2004; Kolovou et al., 2008; Xiangdong et al., 2011; Plump et al., 1992). Conforme recentemente revisado por nosso grupo, as lipoproteínas ricas em triglicerídeos exógenos (quilomícrons) ou endógenos (VLDL) podem transferir parte de seu conteúdo de triglicerídeos para HDL, em troca de ésteres de colesterol, sob ação da enzima CETP. Murinos não expressam tal enzima, de maneira que o colesterol permanece nas partículas de HDL, sendo esta a principal lipoproteína envolvida em seu transporte plasmático (Balarini, Gomes, Vasquez, Meyrelles, & Gava, 2012; Bachorik et al., 2008), conforme observado nos animais controle (tabela 1). Contudo, em animais nos quais o gene que codifica a apolipoproteína E foi silenciado (apoE^{-/-}), a depuração hepática de partículas de VLDL e IDL fica comprometida, visto que depende da ligação da apoE ao receptor hepático de LDL (Anoop et al., 2010), justificando o perfil lipoproteico plasmático alterado neste modelo geneticamente modificado.

Nossos achados estão de acordo com o que é demonstrado na literatura para animais apoE^{-/-} que receberam dieta aterogênica. Plump e colaboradores demonstraram em 1992, quando o modelo apoE^{-/-} foi desenvolvido por seu grupo, que os animais que receberam dieta *Western type* apresentaram incremento no colesterol total e, principalmente, na fração VLDL+IDL. Mesmo quando comparados a animais controle *wild type* (sem modificação genética) que receberam dieta aterogênica, os níveis de colesterol plasmático, LDL e triglicerídeos de animais apoE^{-/-} foram maiores e observou-se uma redução da fração de HDL (d'Uscio et al., 2001a; d'Uscio et al., 2001b; d'Uscio et al., 2002; Gervais et al., 2002).

Interessantemente, não foram observadas alterações do perfil lipoproteico plasmático em camundongos apoE^{-/-} tratados com sildenafil, quando comparados aos animais hipercolesterolêmicos que receberam apenas veículo, em acordo com observações anteriores (Dussault et al., 2009), apesar da melhora obtida na função endotelial e da redução da deposição de placa aterosclerótica. Postula-se que a disfunção endotelial em animais apoE^{-/-} esteja relacionada ao conteúdo de LDL oxidado (oxLDL) e não à hipercolesterolemia em si. Neste caso, a redução do estresse oxidativo, mesmo na manutenção de altas concentrações plasmáticas de colesterol, seria capaz de promover melhora da função endotelial (Jiang et al., 2001).

Observou-se marcante disfunção endotelial em aorta torácica de animais apoE^{-/-} que receberam apenas veículo, conforme demonstrado pelo prejuízo da vasodilatação induzida por acetilcolina (ACh), após pré-contracção com fenilefrina (Phe) (tabela 2, figura 12 A). Sabe-se que o NO é o principal vasodilatador derivado do endotélio em artérias de grande calibre em situações fisiológicas, ao contrário de vasos de resistência, nos quais o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) parece representar o principal vasodilatador (Luksha et al., 2009). O NO é uma molécula multifatorial, que exerce diversas ações potencialmente antiateroscleróticas, tais como efeitos anti-inflamatórios, antiplaquetários e antioxidantes (Kauser et al., 2000; Meyrelles et al., 2011). Sua biodisponibilidade e atividade costumam estar comprometidas na disfunção endotelial. Embora o entendimento atual do processo de aterogênese considere que a disfunção endotelial seja seu evento inicial, estando presente antes mesmo da detecção de evidências de deposição de placa (Aoki et al., 2006; Davignon & Ganz, 2004; Landmesser et al., 2004), a ocorrência de tal disfunção em vasos de animais apoE^{-/-} ainda é um achado controverso na literatura.

Estudos demonstraram que camundongos apoE^{-/-} jovens (entre 16 e 19 semanas), mantidos sob dieta padrão, não apresentaram comprometimento do relaxamento de aorta torácica frente à ACh ou ao ionóforo de cálcio A23187 (Bonthon et al., 1997). Isto é, em animais apenas hipercolesterolêmicos, nos quais a aterosclerose ainda não havia se estabelecido, a disfunção endotelial não estava presente. Foi demonstrado por Fransen e colaboradores que, na ausência de placa aterosclerótica desenvolvida, anéis de aorta torácica de camundongos apoE^{-/-} não apresentavam disfunção endotelial (comprometimento do relaxamento à ACh),

embora tenha sido observado um comprometimento da produção basal de NO (independente do estímulo por ACh), provavelmente devido ao comprometimento da ativação da eNOS pelo cálcio ou ao aumento da expressão de caveolina 1 (uma proteína que exerce efeitos inibitórios sobre a produção de NO) (Fransen et al., 2008).

De maneira bastante interessante, foi demonstrado que animais idosos (18 meses) apresentavam marcante disfunção endotelial em aorta torácica, a qual estava correlacionada à deposição de placa aterosclerótica (Guns et al., 2008). Essas evidências sugerem que a disfunção endotelial neste modelo murino deve estar relacionada à presença de aterosclerose. Deste modo, a utilização de dieta aterogênica, capaz de acelerar o processo aterosclerótico, leva a um quadro de disfunção endotelial. Tal dieta também é conhecida como "*Western-type*" (dieta ocidental), por mimetizar o padrão ocidental de alimentação, no qual se observa ingestão de excesso de gordura e calorias.

No presente estudo, constatou-se a ocorrência de disfunção endotelial em aorta de camundongos apoE^{-/-} que receberam dieta aterogênica, em acordo com o que foi demonstrado por outros autores (d'Uscio et al., 2001a; Wassmann et al., 2006). Tal disfunção está relacionada a uma menor participação da cascata NO/cGMP na resposta vasodilatadora à ACh, conforme demonstrado pela menor diferença na área abaixo da curva quando foi feito bloqueio prévio com L-NAME (figura 13). Considerando que o NO é o principal vasodilatador dependente do endotélio em vasos de condutância (Luksha et al., 2009), era de se esperar que o tratamento das peças com L-NAME praticamente abolisse toda a resposta vasodilatadora à ACh. Contudo, o papel desempenhado pela via NO/cGMP em cada um dos grupos só pode ser comparado pela avaliação da diferença da área abaixo das curvas com e sem bloqueio.

Em adição, observou-se redução da ativação basal da cascata NO/cGMP em animais ateroscleróticos, representada pela redução do incremento de contração à Phe em anéis de aorta obtidos de camundongos apoE^{-/-} tratados com veículo, nos quais foi realizado bloqueio com L-NAME. Este achado está em acordo com observações prévias feitas por Kauser e colaboradores. Em seu estudo, os autores observaram redução do incremento de contração ao análogo de tromboxano U-46619 em anéis de animais apoE^{-/-}, após bloqueio com N^G-nitro-L-arginina (L-NNA), um inibidor da síntese de NO. Os autores postularam que o aumento da contração

mediada por L-NNA é referida como produção basal de NO, visto que reflete a quantidade de NO constitutivamente disponível para modular a contração do músculo liso. Por outro lado, o relaxamento à ACh é referido como produção endotelial de NO estimulada e reflete o NO produzido em resposta à ativação do influxo de cálcio para o interior da célula endotelial, mediado por receptor (Kauser et al., 2000). Fransen e colaboradores também observaram redução da biodisponibilidade basal de NO em aorta de animais apoE^{-/-} submetidos à dieta normal, embora não tenham observado prejuízo na vasodilatação à ACh (Fransen et al., 2008).

No presente estudo, pelo fato de ter sido utilizada uma droga que inibe a enzima PDE5 e, portanto, a degradação do cGMP, o uso da expressão "produção basal de NO" para se referir aos resultados de contração ao L-NAME talvez não seja adequado quando diz respeito aos animais tratados, pois se deve considerar a hipótese de que a produção de NO seja a mesma em ambos os grupos, embora a eficiência de ativação da cascata NO/cGMP esteja aumentada nos animais que receberam sildenafil. Por isso, a expressão "ativação da cascata NO/cGMP" (ou similar) foi utilizada para se referir ao incremento de contração à Phe após bloqueio com L-NAME. A produção de NO propriamente dita foi avaliada por meio da utilização de DAF, o qual torna-se fluorescente na presença de NO. Neste caso pode-se afirmar que os resultados obtidos devem-se a alterações da produção de NO e não apenas ao incremento do conteúdo de cGMP produzido pela inibição da PDE5.

Em animais ateroscleróticos, observou-se tanto o comprometimento da produção de NO (figura 19) quanto da ativação basal da cascata NO/cGMP (figura 16) e da produção de NO/cGMP ativada por ACh (figura 12). Já foi demonstrado que, apesar de apresentarem expressão normal da eNOS, a atividade desta enzima encontrou-se reduzida em animais apoE^{-/-} (d'Uscio et al., 2001a). Em outro estudo, observou-se aumento da expressão da isoforma induzível da NOS (iNOS) em aortas de camundongos apoE^{-/-}, provavelmente para contrabalançar os efeitos deletérios da redução da expressão de enzimas antioxidantes e o consequente aumento do estresse oxidativo nestes animais (Villeneuve et al., 2003). Ainda, sugere-se que, mesmo na presença de expressão normal de eNOS, a sinalização intracelular mediado pelo íon cálcio pode estar comprometida em animais hipercolesterolêmicos, justificando o comprometimento na produção de NO (Fransen et al., 2008). O

comprometimento da funcionalidade da eNOS é, provavelmente, o responsável pela reduzida produção de NO observada em aorta de camundongos apoE^{-/-} que receberam apenas veículo, conforme demonstrado *in situ* pela marcação com DAF (figura 19). Este mesmo achado foi demonstrado em corpo cavernoso de machos apoE^{-/-} submetidos à dieta hiperlipídica durante 7 semanas (Baumhake et al., 2008).

Conforme mencionado, o $\cdot\text{O}_2^-$ é um dos principais radicais livres presentes em situações de estresse oxidativo e reage espontânea e rapidamente com NO para formar ONOO⁻, um poderoso agente oxidante (Pacher et al., 2007). A reação do $\cdot\text{O}_2^-$ com o NO é mais rápida que aquela que ocorre entre o $\cdot\text{O}_2^-$ e a superóxido dismutase (SOD, enzima responsável pela conversão do $\cdot\text{O}_2^-$ em peróxido de hidrogênio, o qual posteriormente é convertido em água e oxigênio pela ação da enzima catalase), comprometendo a biodisponibilidade de NO e, conseqüentemente, a função endotelial (d'Uscio et al., 2001a). Desta maneira, considera-se que um dos principais mecanismos envolvidos na disfunção endotelial em animais apoE^{-/-} é o estresse oxidativo, com o conseqüente comprometimento da biodisponibilidade de NO e a redução da ativação da cascata NO/cGMP que costuma estar associada.

Segundo Jiang e colaboradores, a disfunção endotelial observada em animais apoE^{-/-} deve-se à ação do oxLDL. Por este motivo, a disfunção nestes animais foi observada pelos autores apenas na aorta abdominal, e não na torácica: segundo os mesmos, o segmento abdominal está sujeito a maior estresse oxidativo que o torácico, justificando a maior oxidação de LDL e conseqüente piora na função endotelial (Jiang et al., 2001). Apesar de não observar alteração da resposta à ACh em animais submetidos à dieta normal, Yaghoubi relatou o comprometimento do relaxamento à ACh naqueles que receberam dieta rica em colesterol. Neste grupo, houve aumento da produção de $\cdot\text{O}_2^-$ assim como redução da atividade da SOD (Yaghoubi et al., 2000).

Os achados que relatam incremento de estresse oxidativo em animais apoE^{-/-} estão de acordo com o que foi observado neste trabalho. Quando o bloqueio com apocinina - um antioxidante e inibidor da NADPH oxidase (uma das principais fontes de radicais livres dentro das células) - foi feito antes da realização das curvas de relaxamento, observou-se que a resposta vasodilatadora à ACh dos anéis de camundongos apoE^{-/-} era normalizada, com melhora da resposta máxima e da sensibilidade em relação à ausência de bloqueio (figura 14, tabela 2). Nos animais controle, não houve diferença na resposta vasodilatadora na presença ou ausência

de apocinina, sugerindo que neste grupo o estresse oxidativo não tenha papel de grande importância na vasodilatação. Deste resultado, infere-se que o estresse oxidativo na aorta dos animais apoE^{-/-} que receberam dieta aterogênica é responsável, ao menos em parte, pela disfunção endotelial observada neste grupo, uma vez que quando é bloqueado farmacologicamente, a função do endotélio é normalizada.

Foi demonstrado por Shukla e colaboradores que coelhos hipercolesterolêmicos apresentavam aumento da produção de $\cdot\text{O}_2^-$ em corpo cavernoso, o qual foi revertido pelo tratamento das peças com inibidores da NADPH oxidase, sugerindo que, neste modelo, esta enzima é a principal fonte de ROS (Shukla et al., 2005). De maneira similar ao que observamos em nosso estudo, os autores relatam melhora do relaxamento do tecido cavernoso ao carbacol (um análogo da ACh) quando as peças foram previamente incubadas com inibidores da NADPH oxidase, corroborando a teoria de que o estresse oxidativo é uma das causas da disfunção endotelial na presença de hipercolesterolemia.

Em camundongos, a administração de dieta rica em colesterol promoveu aumento dos níveis de marcadores de estresse oxidativo em aorta, os quais foram normalizados nos animais hipercolesterolêmicos que receberam apocinina (Matsumoto et al., 2006). Em animais apoE^{-/-}, demonstrou-se marcante disfunção endotelial em arteríolas cerebrais, a qual foi revertida pelo tratamento com tempol (um mimético da SOD) ou apocinina (Kitayama et al., 2007). O mesmo perfil foi observado em artérias carótidas neste modelo murino, sem alteração da vasodilatação dependente do endotélio nos camundongos controle (d'Uscio et al., 2001b).

Mais recentemente, foi descrito que a disfunção endotelial em aorta de animais apoE^{-/-} estava associada ao incremento do estresse oxidativo e do conteúdo de oxLDL na placa aterosclerótica (Chen et al., 2010), confirmando a relação entre disfunção endotelial, estresse oxidativo e aterosclerose. Estes resultados corroboram a teoria de que estratégias para a prevenção de eventos cardiovasculares associados à aterosclerose devem focar na melhora do balanço entre NO/ $\cdot\text{O}_2^-$, ao invés de objetivar simplesmente o aumento da produção de NO (Wever et al., 1998).

Conforme recentemente revisado, a NADPH oxidase não é a única fonte de ROS durante o estabelecimento da disfunção endotelial. Na ausência de

quantidades adequadas de cofatores, na presença de excesso de inibidores endógenos e sob a ação de radicais livres, a eNOS pode passar a produzir ROS em maior quantidade que NO (figura 20) (Meyrelles et al., 2011). Neste caso, diz-se que a enzima encontra-se desacoplada, uma alusão ao fato de que sua ativação depende do acoplamento entre a ativação de receptores ligados à proteína G e o incremento de Ca^{2+} no interior da célula endotelial (Wever et al., 1998). Sob outra perspectiva, pode-se afirmar que, nesta situação, a redução do oxigênio torna-se desacoplada da oxidação de L-arginina que gera NO nos domínios catalíticos da enzima (Förstermann & Sessa, 2012; Takaya et al., 2007).

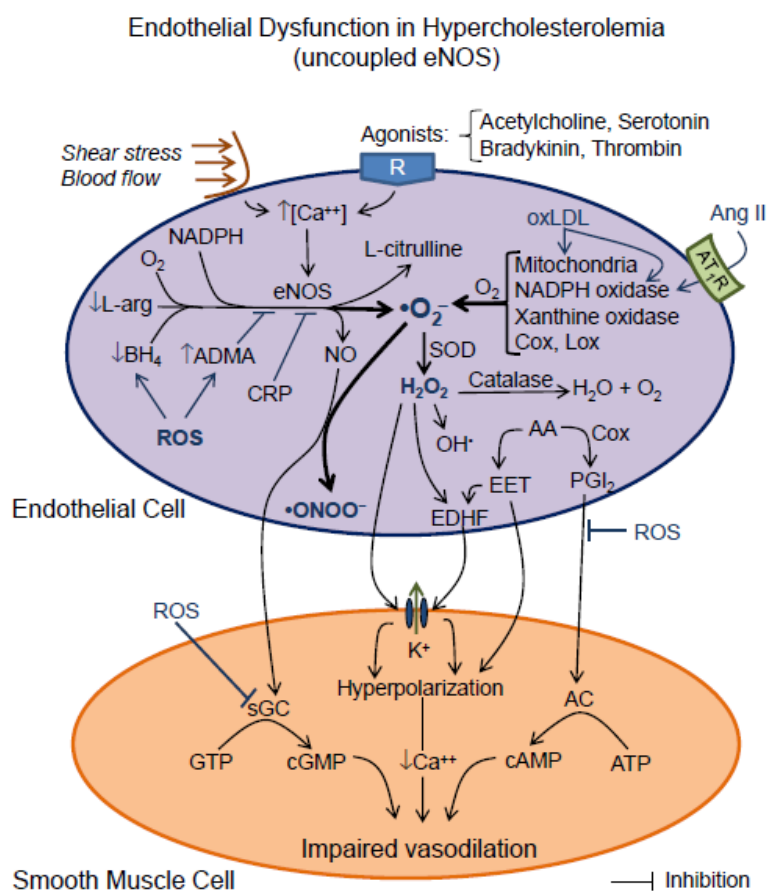


Figura 21: mecanismos intracelulares envolvendo o desacoplamento da eNOS que levam à produção de espécies reativas de oxigênio. Abreviações: AA: ácido araquidônico, Cox: ciclooxigenase, Lox: lipoxigenase, EET: ácido epoxieicosatrienoico, CRP: proteína C reativa, Ang II: angiotensina II, AT1R: receptor de angiotensina tipo 1, AC: adenilato ciclase, cAMP: adenosina monofosfato cíclica (as demais foram citadas ao longo do texto). Adaptado de Meyrelles et al., 2011.

Durante o desacoplamento, além da redução da produção de NO, observa-se o incremento da produção de ROS, sobretudo ânions superóxido. Tal situação torna-se ainda mais preocupante quando se tem em mente a reação entre estas duas moléculas, formando peroxinitrito. Deste modo, o desacoplamento da eNOS surge como um outro potencial mecanismo envolvido na disfunção endotelial em camundongos apoE^{-/-}. Demonstrou-se que, neste modelo, a superexpressão da eNOS no endotélio vascular levou ao aumento da produção de ROS e redução da produção de NO devido à reduzida disponibilidade de BH₄, que leva ao desacoplamento da eNOS (Förstermann & Sessa, 2012; Ozaki et al., 2002). Experimentalmente, o desacoplamento da eNOS pode ser demonstrado pela relação entre a expressão de dímeros e monômeros da enzima. Foi constatado que o modelo apoE^{-/-} apresentou relação dímeros/monômeros reduzida (Ponnuswamy et

al., 2012), confirmando a participação do desacoplamento da eNOS como fonte de ROS e sua corresponsabilidade na disfunção endotelial. Além disso, já foi demonstrado que, em camundongos apoE^{-/-}, há redução da fosforilação da eNOS no resíduo de serina 1179, um importante marcador da ativação da enzima (Yamashiro et al., 2010).

Os resultados obtidos no presente estudo para a avaliação do estresse oxidativo *in vitro* foram confirmados por achados *in situ*. A análise histológica da aorta dos animais revelou que, no grupo apoE^{-/-} que recebeu veículo, a marcação fluorescente com DHE é mais intensa que nos animais controle normocolesterolêmicos, sugerindo maior produção de ROS e confirmando os resultados obtidos nas curvas de relaxamento na presença de apocinina. Outros trabalhos também apontam aumento da marcação com DHE em aorta de animais apoE^{-/-} (Vinh et al., 2008). O estresse oxidativo foi reduzido em animais nos quais a degradação de um inibidor endógeno da eNOS foi aumentada, confirmando que o desacoplamento da eNOS é fonte importante de radicais livres (Jacobi et al., 2010). Além disso, o tratamento de cortes de aorta com um mimético da SOD foi capaz de reduzir a marcação com DHE em animais ateroscleróticos, sugerindo que a redução da capacidade antioxidante pode estar envolvida no estresse oxidativo observado e que o aumento da captação de ânions superóxido pode ser uma boa estratégia antioxidante nestes animais (d'Uscio et al., 2001a).

Outro importante marcador de estresse oxidativo *in situ* é a nitrotirosina, a qual é formada pelo efeito de nitração do peroxinitrito sobre resíduos de tirosina em proteínas celulares, servindo como uma "impressão digital" da presença do peroxinitrito (Hsiai & Berliner, 2007; Korkmaz et al., 2009). A marcação para nitrotirosina foi confirmada na presença de aterosclerose (Pacher et al., 2007), reafirmando a ocorrência de um comprometimento na biodisponibilidade de NO provocada pelo excesso de $\cdot\text{O}_2^-$ e o consequente prejuízo da função endotelial.

Alguns estudos sugerem que a redução da sensibilidade do músculo liso vascular ao óxido nítrico também pode estar envolvida no comprometimento da resposta vasodilatadora em animais apoE^{-/-}. A construção de curvas de relaxamento ao doador de NO nitroprussiato de sódio (NPS) permite a avaliação desta resposta *in vitro*. Embora alguns trabalhos relatem redução da sensibilidade do músculo liso vascular dos camundongos apoE^{-/-} a doadores de NO (d'Uscio et al., 2001a; d'Uscio et al., 2002), já foi demonstrado por nosso grupo em leito arteriolar mesentérico

(Arruda et al., 2005) e pelo presente trabalho e por outros autores em aorta (Baumhake et al., 2008; Chen et al., 2010; Custodis et al., 2008; Jacobi et al., 2010; Vinh et al., 2008; Wassmann et al., 2006; Yaghoubi et al., 2000) que não há diferença na resposta vasodilatadora a doadores de NO em animais apoE^{-/-} quando comparados aos animais controle, demonstrando a preservação da sensibilidade do músculo liso ao óxido nítrico. Provavelmente esta diferença seja devida aos diferentes tempos de administração de dieta aterogênica entre os estudos. Naqueles que, assim como este, não observaram diferenças, os animais foram alimentados com dieta aterogênica durante aproximadamente 8 semanas, contra cerca de 30 semanas nos estudos de d'Uscio e colaboradores.

Conforme mencionado anteriormente, aterosclerose é um evento inflamatório que culmina com a deposição lipídica no espaço subendotelial, comprometendo o lúmen vascular e que tem como fatores de risco a hipercolesterolemia e a disfunção endotelial (Libby et al., 2010; Libby et al., 2011; Libby, 2002; Packard & Libby, 2008; Ross, 1999). Desta maneira, intuitivamente, já é esperada a considerável deposição de placa aterosclerótica na aorta de camundongos apoE^{-/-} submetidos à dieta hiperlipídica. Nestes animais, a análise histológica de cortes corados com *Oil-red* revelou um comprometimento importante da luz vascular quando comparados aos controles normocolesterolêmicos (aproximadamente 38% do lúmen).

A deposição de placa aterosclerótica nos animais apoE^{-/-} foi bem descrita na literatura desde o desenvolvimento simultâneo deste modelo murino por dois grupos de pesquisa independentes (Piedrahita et al., 1992; Plump et al., 1992). Desde então, estes camundongos vem sendo utilizados com sucesso como modelos experimentais de aterosclerose similar à humana e são considerados boas ferramentas experimentais para a avaliação de novas terapias antiateroscleróticas (Vasquez et al., 2012). O comprometimento da função endotelial neste modelo é acompanhado pela alteração de estrutura do endotélio, revelada pela MET, assim como foi observado anteriormente (Foteinos et al., 2008; Reddick et al., 1994).

Neste estudo pioneiro, observou-se que o tratamento com sildenafil foi eficaz em reduzir a deposição de placa aterosclerótica no modelo murino deficiente em apoE. Houve redução de aproximadamente 40% na obstrução da luz vascular nos animais tratados com sildenafil durante 3 semanas, acompanhada da melhora da função endotelial e de redução no estresse oxidativo, apesar de não ter sido observada mudança no perfil lipoproteico plasmáticos dos animais estudados.

Considerando que a disfunção endotelial é um dos eventos iniciais do processo de aterogênese, era de se esperar que a melhora da função endotelial se refletisse na redução da deposição de placa aterosclerótica. Este trabalho é o primeiro a demonstrar que o tratamento crônico com um inibidor da PDE5 foi capaz de melhorar a função endotelial na aterosclerose experimental.

Em 2008, Schäfer e colaboradores demonstraram que o tratamento com sildenafil melhorou a vasodilatação induzida por ACh em ratos diabéticos. Neste elegante trabalho, os autores avaliaram tanto os efeitos crônicos do tratamento durante duas semanas, quando os efeitos agudos da administração de sildenafil, realizada 2 horas antes da execução dos experimentos de reatividade vascular. Ainda, foi avaliado o efeito direto *in vitro* da administração da droga em anéis de aorta de animais diabéticos e controle. Os autores observaram que o sildenafil, *in vitro*, foi capaz de gerar respostas vasodilatadoras quando aplicado em doses crescentes, após pré-contracção com Phe. Tal resposta deve-se, dentre outros fatores, ao aumento da sinalização da cascata NO/cGMP, uma vez que o tratamento das peças com L-NNA foi capaz de abolir parcialmente a vasodilatação observada. A administração aguda da droga 2 horas antes da avaliação da reatividade vascular melhorou o relaxamento à ACh nos animais diabéticos. Além dos efeitos direto e agudo do sildenafil, os autores relataram melhora da função endotelial dos animais diabéticos tratados cronicamente durante 2 semanas (Schäfer et al., 2008).

Estes achados permitem afirmar que o sildenafil apresenta efeitos benéficos vasculares, aumentando a ativação da cascata NO/cGMP, em acordo com a constatação feita no presente estudo de que a participação do NO na resposta vasodilatadora à ACh estava aumentada nos animais tratados (demonstrada pelo aumento da área abaixo da curva na presença de bloqueio com L-NAME, figura 13), além do aumento da ativação basal da cascata NO/cGMP (figura 16) e da produção de NO (figura 19). Desta maneira, esta droga surge como uma promissora estratégia para intervenção farmacológica em pacientes nos quais a disfunção endotelial apresenta-se como um fator de risco extra ao desenvolvimento de complicações cardiovasculares maiores, como é o caso do diabetes e da aterosclerose. Clinicamente, foi registrado que a administração diária de sildenafil foi capaz de melhorar a função endotelial em pacientes diabéticos (Deyoung et al., 2012), podendo se refletir, a longo prazo, na redução de risco cardiovascular.

Já foi demonstrado, em coelhos hipercolesterolêmicos, que a inibição aguda da PDE5 foi capaz de reverter a disfunção endotelial causada pela hipercolesterolemia em tecido cavernoso, melhorando a resposta à ACh. Além disso, o sildenafil foi capaz de causar efeito vasodilatador direto, avaliado pela construção de curva-dose resposta. Esta melhora na função vascular, neste modelo, pareceu estar associada à redução do estresse oxidativo, visto que a produção de $\cdot\text{O}_2^-$ foi diminuída na presença da droga (Shukla et al., 2005). Conforme discutido, o aumento da produção de radicais livres é uma das causas da disfunção endotelial na presença de hipercolesterolemia, visto que compromete a disponibilidade de NO. Deste modo, o efeito antioxidante do sildenafil explica parte de seu papel na melhora da função endotelial.

Estas observações corroboram o que foi constatado no presente estudo *in vitro* e *in situ*. Os camundongos apoE^{-/-} tratados com sildenafil apresentaram redução da marcação com DHE em cortes histológicos de aorta (figura 18). Além disso, o bloqueio com apocinina praticamente não alterou a resposta vasodilatadora à ACh, ao contrário do que ocorreu nos animais hipercolesterolêmicos que receberam veículo (figura 14), demonstrando que a redução do estresse oxidativo vascular nos animais tratados está envolvida na melhora da função endotelial.

Conforme discutido, o desacoplamento da eNOS é considerado um importante mecanismo responsável pela disfunção endotelial, acompanhada pelo aumento da produção de ROS gerado pela enzima (Meyrelles et al., 2011). Relatou-se que razão dímeros/monômeros da enzima estava aumentada em ratos diabéticos (os quais apresentaram aumento de estresse oxidativo e disfunção endotelial) e foi reduzida pelo tratamento crônico com sildenafil (Schäfer et al., 2008), sugerindo que esta droga é capaz de reverter o desacoplamento da eNOS. Além disso, verificou-se que o sildenafil aumentou a transcrição do RNA mensageiro e a expressão proteica das isoformas endotelial e induzível da NOS após administração aguda em cardiomiócitos em cultura (Das et al., 2005) e em células cardíacas *in vivo* (Salloum et al., 2003), o que pode contribuir para a melhora da eficiência na produção de NO. De fato, além de reduzir a marcação para nitrotirosina em camundongos apoE^{-/-} tratados (Dussault et al., 2009), o sildenafil foi capaz de potencializar o surpreendente efeito vasodilatador do peroxinitrito, que também está relacionado ao aumento do conteúdo celular de cGMP (Li J, 2005).

Em adição, corroborando nossas observações, demonstrou-se que o tratamento crônico com inibidor da PDE5 foi capaz de reduzir o estresse oxidativo vascular em aorta de ratos diabéticos, embora o tratamento *in vitro* das peças com sildenafil não tenha sido eficiente em melhorar este parâmetro. Provavelmente, neste caso, a redução do estresse oxidativo se deva à redução da expressão de uma das subunidades da enzima NADPH oxidase (gp91^{phox}) nos animais tratados cronicamente, além da redução da expressão de Rac-1, proteína envolvida na ativação da NADPH oxidase (Schäfer et al., 2008). Por outro lado, o sildenafil mostrou-se eficiente em reduzir o estresse oxidativo gerado pelo aumento da atividade e expressão da subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase em células de músculo liso cavernoso, em cultura. Acredita-se que este efeito antioxidante do sildenafil deva-se à inibição da PDE5 e ao incremento do conteúdo de cGMP, visto que a inibição da guanilato ciclase solúvel pelo ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazole[3,4]quinoxaline-1-nona) é capaz de abolir esta resposta. Deste modo, é gerada uma cascata autoalimentadora, na qual a inibição da PDE5 reduz o estresse oxidativo, aumentando a biodisponibilidade de NO, que apresenta efeitos antioxidantes (redução da atividade e expressão de NADPH oxidase) (Koupparis et al., 2005).

O estresse oxidativo pode ser causado não apenas pelo aumento da produção de ROS, mas também pela redução da capacidade antioxidante celular (Touyz, 2004). Interessantemente, foi demonstrado que a inibição da PDE5 em ratos diabéticos foi capaz de promover o aumento da capacidade antioxidante total (Milani et al., 2005), incluindo esta via como mais um possível mecanismo pelo qual o sildenafil é capaz de melhorar a função vascular.

Conforme discutido, a aterosclerose é um processo inflamatório, que se inicia com uma agressão ao endotélio mas que também apresenta outros processos importantes que podem ser modulados. Neste caso, a inibição crônica da PDE5 pode favorecer a redução da deposição de placa por outros mecanismos, além da melhora da função endotelial. Foi apontado que o tratamento crônico de pacientes diabéticos com sildenafil reduziu a concentração de marcadores inflamatórios como proteína C reativa e interleucina 6, além de moléculas de adesão como ICAM e VCAM (Aversa et al., 2008). Também foi visto que a inibição crônica da PDE5 em camundongos diabéticos, ao aumentar a capacidade antioxidante, promoveu redução de apoptose em células cardíacas (Ebrahimi et al., 2009), o que poderia

contribuir para a redução da aterogênese se os resultados extrapolassem para o tecido vascular, mantendo relação com a melhora da estrutura endotelial dos animais tratados.

Recentemente foi demonstrado que o tratamento de camundongos apoE^{-/-} com sildenafil em dose similar à utilizada neste estudo foi capaz de modular positivamente a funcionalidade de células progenitoras endoteliais, aumentando sua capacidade de migração e adesão, provavelmente devido a seus efeitos antioxidantes (Dussault et al., 2009). Considerando que o tratamento com células tronco mononucleares é capaz de reduzir a deposição de placa aterosclerótica e a oclusão vascular induzida pelo estresse de cisalhamento, potencialmente devido ao aumento da migração de células progenitoras endoteliais para os locais de lesão (Lima et al., 2012; Porto et al., 2011), a melhora da funcionalidade destas células pode ser um outro mecanismo pelo qual a inibição da PDE5 favorece a redução da aterosclerose.

A principal consequência da aterosclerose é a ruptura de placa com formação de trombos, que podem migrar e gerar processos isquêmicos (Da Luz e Uint, 2003). Neste caso, a inibição da ativação plaquetária promovida pelo tratamento com sildenafil (Halcox et al., 2002) também se mostra vantajosa no que diz respeito à redução da ocorrência de eventos cardiovasculares em pacientes pertencentes a grupos de risco.

Recentemente tem havido maior atenção ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas que tenham como alvo outros fatores de risco cardiovascular além da hipercolesterolemia (Zadelaar et al., 2007). De maneira análoga ao que foi constatado neste estudo, algumas estatinas demonstraram efeitos pleiotrópicos com propriedades ateroprotetoras independentes de reduções de colesterol plasmático. Tais propriedades incluem melhora da função endotelial e inibição da inflamação e oxidação vascular (Zhou & Liao, 2010). Deste modo, este trabalho propõe que os efeitos vasculares benéficos do sildenafil, mesmo na ausência de alterações do perfil lipídico plasmático, oferecem uma nova perspectiva para o uso de inibidores da PDE5 na melhora da disfunção endotelial e redução da aterosclerose.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Demonstrou-se pela primeira vez, com este trabalho, que o tratamento crônico com sildenafil exerce efeitos vasculares benéficos na aterosclerose experimental. O tratamento proporcionou a melhora da função endotelial nos animais doentes (ateroscleróticos), a qual se reverteu em redução da deposição de placa aterosclerótica, mesmo na ausência de modificação do perfil lipídico plasmático, confirmando a hipótese inicial. Os mecanismos envolvidos no benefício vascular envolvem a redução do estresse oxidativo e o aumento da produção de óxido nítrico, ambos contribuindo para uma maior biodisponibilidade deste vasodilatador.

Este estudo confirma que o sildenafil é uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da aterosclerose em pacientes de alto risco. Entretanto, investigações clínicas futuras são necessárias para confirmar a segurança desta abordagem farmacológica nestes pacientes, sobretudo naqueles que fazem uso de antianginosos doadores de óxido nítrico.

Referências

REFERÊNCIAS

- Anoop S, Misra A, Meena K, Luthra K. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases. *The Indian Journal of Medical Research*. 2010;132:363–378.
- Aoki R, Ikarugi H, Naemura A, Ijiri Y, Yamshita T, Yamamoto J. Endothelial dysfunction precedes atherosclerotic lesions and platelet activation in high fat diet-induced prothrombotic state. *Thrombosis Research*. 2006;117(5):529–535.
- Arruda RM, Peotta VA, Meyrelles SS, Vasquez EC. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. *Hypertension*. 2005;46(4):932–936.
- Aversa A, Vitale C, Volterrani M, Frabbrit A, Spera G, Fini M, Rosano GMC. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes. *Diabetic medicine*. 2008;25(1):37–44.
- Balarini CM, Gomes IBS, Vasquez EC, Meyrelles SS, Gava AL. Understanding the Role of Apolipoprotein E in Cardiovascular and Renal Diseases. In: Sidorov AD e Nikitin MY. *Apolipoproteins. Regulatory Functions, Health Effects and Role in Disease*. New York: Nova Science Publishers, 2012. Cap 3, p. 59–74.
- Bachorik PS, Denke MA, Stein EA, Rifkind BM. Lipids and Dyslipoproteinemias. In: Henry JB. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Pennsylvania: Saunders Company, 2008. p259–287.
- Baumhakel M, Custodis F, Schlimmer N, Laufs U, Böhm M. Improvement of endothelial function of the corpus cavernosum in apolipoprotein E knockout mice treated with irbesartan. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008;327(3):692–698.
- Bivalacqua TJ, Sussan TE, Gebska MA, Strong TD, Berkowitz DE, Biswal S, Burnett AL, Champion HC. Sildenafil inhibits superoxide formation and prevents endothelial dysfunction in a mouse model of secondhand smoke induced erectile dysfunction. *The Journal of Urology*. 2009;181(2):899–906.
- Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1997;17(11):2333–2340.
- Bryan RM, You J, Golding EM, Marrelli SP. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Anesthesiology*. 2005;102(6):1261–1277.
- Chen X, Zhang H, McAfee S, Zhang C. The reciprocal relationship between adiponectin and LOX-1 in the regulation of endothelial dysfunction in ApoE

- knockout mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory physiology*. 2010;299(3):H605–612.
- Custodis F, Baumhäkel M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Böhm M, Lafs U. Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2008;117(18):2377–2387.
- Da Luz PL, Uint L. Endotélio na Aterosclerose: Interações Celulares e Vasomotricidade. In: Da Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio e Doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu, 2003. Cap. 10, p. 133-160.
- Das A, Xi L, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(13):12944–12955.
- DATASUS, Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. Disponível em <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php> Acesso 07/03/2013.
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(23 Suppl 1):III27–32.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E Polymorphism and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988;8:1–21.
- De Melo SESFC. Efeitos cardiovasculares do citrato de sildenafil na miocardiopatia hipertensiva induzida pela inibição da síntese de óxido nítrico em ratos. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 133 p. Tese de Doutorado.
- De Meyer GR, Herman AG. Vascular Endothelial Dysfunction. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1997;39(4):325–342.
- Deyoung L, Chung E, Kovac JR, Romano W, Brock GB. Daily use of sildenafil improves endothelial function in men with type 2 diabetes. *Journal of Andrology*. 2012;33(2):176–180.
- dos Santos RL, Podratz PL, Sena GC, Filho VSD, Lopes PFI, Gonçalves WLS, Alves LM, Samoto VY, Takiya CM, de Castro Miguel E, Moysés MR, Graceli JB. Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17 β -estradiol in isolated rat heart. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2012;75(16-17):948–959.
- Dussault S, Maingrette F, Ménard C, Michaud SE, Haddad P, Groleau J, Turgeon J, Perez G, Rivard A. Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension*. 2009;54(5):1043–1049.
- d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CB, Smith L, Weiler D, Sieck GC, Katusic ZS. Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001a;21(6):1017–1022.

- d'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Lüscher TF. Chronic ET(A) receptor blockade prevents endothelial dysfunction of small arteries in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovascular Research*. 2002;53(2):487–495.
- d'Uscio LV, Smith LA, Katusic ZS. Hypercholesterolemia Impairs Endothelium-Dependent Relaxations in Common Carotid Arteries of Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Stroke*. 2001b;32(11):2658–2664.
- Ebrahimi F, Shafaroodi H, Asadi S, Nezami BG, Ghasemi M, Rahimpour S, Hashemi M, Doostar Y, Dehpour AR. Sildenafil decreased cardiac cell apoptosis in diabetic mice: reduction of oxidative stress as a possible mechanism. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009;87(7):556–564
- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012;33(7):829–837.
- Foteinos G, Hu Y, Xiao Q, Metzler B, Xu Q. Rapid endothelial turnover in atherosclerosis-prone areas coincides with stem cell repair in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2008;117(14):1856–1863.
- Fransen P, Van Assche T, Guns PJ, Van Hove CE, De Keulenaer GW, Herman AG, Bult H. Endothelial function in aorta segments of apolipoprotein E-deficient mice before development of atherosclerotic lesions. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 2008;455(5):811–818.
- Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Bioscience Reports*. 1999;19(4):235–251.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373–376.
- Gervais M, Pons S, Nicoletti A, Cosson C, Giudicelli JF, Richer C. Fluvastatin prevents renal dysfunction and vascular NO deficit in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002;23(2):183–189.
- Glossmann H, Petrischor H, Bartsch G. Molecular mechanisms of the effects of sildenafil. *Experimental Gerontology*. 1999;34(3):305–318.
- Greenow K, Pearce NJ, Ramji DP. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine*. 2005;83(5):329–342.
- Guns PJ, Van Assche T, Verreth W, Fransen P, Mackness B, Mackness M, Holvoet P, Bult H. Paraoxonase 1 gene transfer lowers vascular oxidative stress and improves vasomotor function in apolipoprotein E-deficient mice with pre-existing atherosclerosis. *British Journal of Pharmacology*. 2008;153(3):508–516.
- Halcox JPJ, Nour KRA, Zalos G, Mincemoyer R, Waclawiw MA, Rivera CE, Willie G, Ellahham S, Quyyumi AA. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(7):1232–1240.

- Harrison DG, Ohara Y. Physiologic consequences of increased vascular oxidant stresses in hypercholesterolemia and atherosclerosis: implications for impaired vasomotion. *The American Journal of Cardiology*. 1995;75(6):75B–81B.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circulation Journal*. 2009;73(3):411–418.
- Hsiai T, Berliner JA. Oxidative stress as a regulator of murine atherosclerosis. *Current Drug Targets*. 2007;8(12):1222–1229.
- Jacobi J, Maas R, Cardounel AJ, Arend M, Pope AJ, Cordasic N, Heusinger-Ribeiro J, Atzler D, Strobel J, Schwedhelm E, Böger RH, Hilgers KF. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by lowering asymmetric dimethylarginine. *The American Journal of Pathology*. 2010;176(5):2559–2570.
- Jawień J, Nastalek P, Korbut R. Mouse Models of Experimental Atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2004;55(3):503–517.
- Jiang F, Gibson AP, Dusting GJ. Endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins in isolated mouse aorta: a comparison with apolipoprotein-E deficient mice. *European Journal of Pharmacology*. 2001;424(2):141–149.
- Johansson ME, Hägg U, Wikström J, Wickman A, Bergström G, Gan L. Haemodynamically significant plaque formation and regional endothelial dysfunction in cholesterol-fed ApoE^{-/-} mice. *Clinical Science*. 2005;108(6):531–538.
- Kauser K, Da Cunha V, Fitch R, Mallari C, Rubanyi GM. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2000;278(5):H1679–1685.
- Kitayama J, Faraci FM, Lentz SR, Heistad DD. Cerebral vascular dysfunction during hypercholesterolemia. *Stroke*. 2007;38(7):2136–2141.
- Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Apolipoprotein E knockout models. *Current Pharmaceutical Design*. 2008;14(4):338–351.
- Korkmaz S, Radovits T, Barnucz E, Neugebauer P, Arif R, Hirschberg K, Loganathan S, Seidel B, Karck M, Szabó G. Dose-dependent effects of a selective phosphodiesterase-5-inhibitor on endothelial dysfunction induced by peroxynitrite in rat aorta. *European Journal of Pharmacology*. 2009;615(1-3):155–162.
- Koupparis AJ, Jeremy JY, Muzaffar S, Persad R, Shukla N. Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47 NAD[P]H oxidase induced by the thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. *BJU international*. 2005;96(3):423–427.

- Koyama H, Bornfeldt KE, Fukumoto S, Nishizawa Y. Molecular Pathways of Cyclic Nucleotide-Induced Inhibition of Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation. *Journal of Cellular Physiology*. 2001;186(1):1–10.
- Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):II27–33.
- Li J, Li W, Altura BT, Altura BM. Peroxynitrite-induced relaxation in isolated rat aortic rings and mechanisms of action. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005;209(3):269–276.
- Li W, Asagami T, Matsushita H, Lee KH, Tsao PS. Rosuvastatin attenuates monocyte-endothelial cell interactions and vascular free radical production in hypercholesterolemic mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;313(2):557–562.
- Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(1):319–324.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868–874.
- Libby P, DiCarli M, Weissleder R. The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets. *Journal of Nuclear Medicine*. 2010;51(Suppl 1):33S–37S.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317–325.
- Lima LCF, Porto ML, Campagnaro BP, Tonini CL, Nogueira BV, Pereira TM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Mononuclear cell therapy reverts cuff-induced thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids in Health and Disease*. 2012;11(1):96.
- Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009;202(2):330–344.
- Matsumoto T, Miyamori K, Kobayashi T, Kamata K. Apocynin normalizes hyperreactivity to phenylephrine in mesenteric arteries from cholesterol-fed mice by improving endothelium-derived hyperpolarizing factor response. *Free Radical Biology & Medicine*. 2006;41(8):1289–1303.
- Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24(6):1006–1014.
- Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TMC, Vasquez EC. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in Health and Disease*. 2011;10(1):211.

- Milani E, Nikfar S, Khorasani R, Zamani MJ, Abdollahi M. Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2005;140(2):251–255.
- Mitchell JA, Ali F, Bailey F, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Experimental Physiology*. 2008;93(1):141–147.
- Moncada S, Higgs A. Mechanisms of Disease: The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine*. 1993;329(27):2002–2012.
- MS, Ministério da Saúde. 2011. *Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil*. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cartilha_plano.pdf
Acesso 07/03/2013
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1994;14(1):133–140.
- Niebauer J, Dulak J, Chan JR, Tsao PS, Cooke JP. Gene transfer of nitric oxide synthase. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999;34(4):1201–1207.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993;91(6):2546–2551.
- Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, Hirata K, Yasui H, Sakurai H, Yoshida Y, Masada M, Yokoyama M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2002;110(3):331–340.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiology Reviews*. 2007;87(1):315–424.
- Packard RRS, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clinical Chemistry*. 2008;54(1):24–38.
- Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(10):4471–4475.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71(2):343–353.

- Ponnuswamy P, Schrötle A, Ostermeier E, Grüner S, Huang PL, Ertl G, Hoffmann U, Nieswandt B, Kuhlencordt PJ. eNOS protects from atherosclerosis despite relevant superoxide production by the enzyme in apoE^{-/-} mice. *PloS One*. 2012;7(1):e30193.
- Porto ML, Lima LCF, Pereira TMC, Nogueira BV, Tonini CL, Campagnaro BP, Meyrelles SS, Vasquez EC. Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. *Lipids in Health and Disease*. 2011;10(1):155.
- Raja SG, Nayak SH. Sildenafil: emerging cardiovascular indications. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2004;78(4):1496–1506.
- Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1994;14(1):141–147.
- Ribeiro F, Alves AJ, Teixeira M, Ribeiro V, Duarte JA, Oliveira J. Endothelial function and atherosclerosis: circulatory markers with clinical usefulness. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2009;28(10):1121–1151.
- Rizzo NO, Maloney E, Pham M, Luttrell I, Wessells H, Tateya S, Daum G, Handa P, Schwartz MW, Kim F. Reduced NO-cGMP Signaling Contributes to Vascular Inflammation and Insulin Resistance Induced by High-Fat Feeding. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010;30(4):758–765.
- Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*. 1999;340(2):115–126.
- Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1993;22(Supl 4):S1–14.
- Rudolph V, Freeman BA. Cardiovascular consequences when nitric oxide and lipid signaling converge. *Circulation Research*. 2009;105(6):511–522.
- Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circulation Research*. 2003;93(4):280–291.
- Salloum F, Yin C, Xi L, Kukreja RC. Sildenafil Induces Delayed Preconditioning Through Inducible Nitric Oxide Synthase-Dependent Pathway in Mouse Heart. *Circulation Research*. 2003;92(6):595–597.
- Sanz J, Fayad ZA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature*. 2008;451(7181):953–957.
- SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2007. *IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose*. Disponível em http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2007/IV_diretriz_DA.asp Acesso 07/03/2013

- SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2012. *Carta do Rio de Janeiro*. Disponível em http://cardiol.br/brasilprevent/2012/pdf/Carta_do_Rio_Portugues.pdf Acesso 07/03/2013.
- Schachnik NCC. Uso da citometria de fluxo para análise de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com nefropatia crônica de enxerto. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2008. 129 p. Dissertação de Mestrado.
- Schäfer A, Fraccarollo D, Pförtch S, Flierl U, Vogt C, Pfrang J, Kobsar A, Renné T, Eigenthaler M, Ertl G, Bauersachs J. Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the PDE-5 inhibitor sildenafil in experimental diabetes mellitus. *British Journal of Pharmacology*. 2008;153(5):886–893.
- Sharikabad MN, Østbye KM, Lyberg T, Brørs O. Effect of extracellular Mg²⁺ on ROS and Ca²⁺ accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2013;280(1): H344–H353.
- Shukla N, Jones R, Persad R, Angelini GD, Jeremy JY. Effect of sildenafil citrate and a nitric oxide donating sildenafil derivative, NCX 911, on cavernosal relaxation and superoxide formation in hypercholesterolaemic rabbits. *European Journal of Pharmacology*. 2005;517(3):224–231.
- Takaya T, Hirata K, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Inoue N, Yada T, Goto M, Fuktso A, Hayashi T, Alp NJ, Channon KM, Yokoyama M, Kawashima S. A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(7):1632–1637.
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004;44(3):248–252.
- Vanhoutte PM. Endothelial Dysfunction - The First Step Toward Coronary Arteriosclerosis. *Circulation Journal*. 2009;73(4):595–601.
- Vasquez EC, Peotta VA, Gava AL, Pereira TM, Meyrelles SS. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Journal of Biomedical Science*. 2012;19:22.
- Villeneuve N, Fortuno A, Sauvage M, Fourrier N, Breugnot C, Jacquemin C, Petit C, Gosgnach W, Carpentier N, Vanhoutte P, Vilaine JP. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. *Journal of Vascular Research*. 2003;40(2):87–96.
- Vinh A, Widdop RE, Drummond GR, Gaspari TA. Chronic angiotensin IV treatment reverses endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice. *Cardiovascular Research*. 2008;77(1):178–187.

- Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *American Journal of Cardiology*. 1997;79(3):350–354.
- Wassmann S, Czech T, van Eickels M, Fleming I, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation*. 2004;110(19):3062–3067.
- Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circulation Research*. 2006;99(8):e74–83.
- Wever R, Stroes E, Rabelink TJ. Nitric oxide and hypercholesterolemia: a matter of oxidation and reduction? *Atherosclerosis*. 1998;137:S51–S60.
- WHO, World Health Organization. 2011. *Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control*. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/ Acesso 07/03/2013
- Xiangdong L, Yuanwu L, Hua Z, Liming R, Qiuyan L, Ning L. Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein & Cell*. 2011;2(3):189–201.
- Yaghoubi M, Oliver-Krasinski J, Cayatte AJ, Cohen RA. Decreased sensitivity to nitric oxide in the aorta of severely hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2000;36(6):751–757.
- Yamashiro K, Milsom AB, Duchene J, Panayiotou C, Urabe T, Hattori N, Ahluwalia A. Alterations in nitric oxide and endothelin-1 bioactivity underlie cerebrovascular dysfunction in ApoE-deficient mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30(8):1494–1503.
- Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, De Vries-Van der Weij J, Van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(8):1706–1721.
- Zhang H, Wu LM, Wu J. Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators of Inflammation*. 2011;2011:949072.
- Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. *Circulation Journal*. 2010;74(5):818–826.

